



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119968460 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 09

(21) 申请号 202380068690.1

(22) 申请日 2023.09.27

(30) 优先权数据

2022-153698 2022.09.27 JP

2023-090460 2023.05.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.03.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/035181 2023.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/071212 JA 2024.04.04

(71) 申请人 庆应义塾

地址 日本东京

(72) 发明人 佐藤俊朗 矢野智树

(74) 专利代理机构 北京博思佳知识产权代理有限公司 11415

专利代理师 方志炜

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

权利要求书1页 说明书24页 附图29页

(54) 发明名称

用于在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物

(57) 摘要

一种以Hippo信号通路抑制剂为有效成分、用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物、类器官的增殖方法、通过所述增殖方法增殖的类器官、用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物、类器官的制造方法、通过所述制造方法制造的类器官、再生医疗制剂、以及能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物的筛选方法。

1. 一种用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,所述药物的有效成分为Hippo信号通路抑制剂。
2. 根据权利要求1所述的用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,所述Hippo信号通路抑制剂为MST1/2激酶抑制剂或大肿瘤抑制激酶(LATS)1/2激酶抑制剂。
3. 根据权利要求1或2所述的用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,所述药物还包括与gp130结合的细胞因子家族。
4. 根据权利要求1或2所述的用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,所述类器官为上皮类器官。
5. 一类器官的增殖方法,包括在存在Hippo信号通路抑制剂且不存在细胞外基质的条件下培养类器官的工序。
6. 根据权利要求5所述的类器官的增殖方法,其中,在无血清条件下进行所述类器官的培养。
7. 一类器官,其中,所述类器官是通过权利要求5或6所述的增殖方法增殖的。
8. 一种用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,所述药物的有效成分为Hippo信号通路抑制剂。
9. 根据权利要求8所述的用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,所述Hippo信号通路抑制剂为MST1/2激酶抑制剂或LATS1/2激酶抑制剂。
10. 根据权利要求8或9所述的用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,所述药物还包括与gp130结合的细胞因子家族。
11. 根据权利要求8或9所述的用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,所述类器官为上皮类器官。
12. 一类器官的制造方法,包括在存在Hippo信号通路抑制剂且不存在细胞外基质的条件下建立类器官的工序。
13. 根据权利要求12所述的类器官的制造方法,其中,在存在与gp130结合的细胞因子家族的条件下进行所述类器官的建立。
14. 根据权利要求12或13所述的类器官的制造方法,其中,在无血清条件下进行所述类器官的建立。
15. 一类器官,其中,所述类器官是通过权利要求12或13所述的制造方法制造的。
16. 一种再生医疗制剂,其中,所述再生医疗制剂的有效成分为权利要求15所述的类器官。
17. 一种能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物的筛选方法,包括:
在存在待测物质且不存在细胞外基质的条件下培养类器官的工序;以及
评估所述类器官的增殖的工序;
其中,与在存在所述待测物质的条件下相比所述类器官的增殖较高,表示所述待测物质为能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物。

用于在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物。更详细而言，本发明涉及用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物、类器官的增殖方法、通过所述增殖方法增殖的类器官、用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物、类器官的制造方法、通过所述制造方法制造的类器官、再生医疗制剂、以及能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物的筛选方法。本申请主张2022年9月27日在日本申请的日本专利申请2022-153698号、以及2023年5月31日在日本申请的日本专利申请2023-090460号的优先权，并将其内容引用于此。

背景技术

[0002] 类器官培养技术已开发，有望应用于药物研发和再生医疗。培养类器官需要Matrigel(注册商标)等细胞外基质(例如，参照专利文献1、非专利文献1等)。Matrigel(注册商标)是移植到小鼠体内的肿瘤的提取物，因此是动物源产品。此外，由于存在混入未知的病毒的可能性、价格高昂等，在类器官的培养中使用Matrigel(注册商标)是医疗应用的障碍。而且，从动物保护的角度来看Matrigel的使用也是一个问题。类器官技术出现以来，一直在积极进行Matrigel(注册商标)的替代物质的开发工作(例如，参照非专利文献2)。

[0003] 相关技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本专利特开2016-198033号公报

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:S Rezakhani, et al., Extracellular matrix requirements for gastrointestinal organoid cultures, Biomaterials, 276, 121020, 2021.

[0008] 非专利文献2:Jeong Hyun Heo, et al., Engineering the Extracellular Matrix for Organoid Culture, Int J Stem Cells, 15(1), 60-69, 2022.

发明内容

[0009] [发明要解决的问题]

[0010] 以往，使用合成细胞外基质、胶原蛋白等作为Matrigel(注册商标)的替代物质，但由于类器官的培养效率不够高，没有得到广泛应用。

[0011] 因此，本发明的目的在于提供一种在不存在细胞外基质的条件下制备并培养类器官的技术。

[0012] [用于解决问题的方案]

[0013] 本发明包括以下方面。

[0014] [1]一种用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物，其中，该药物的有效成分为Hippo信号通路抑制剂。

[0015] [2]根据[1]所述的用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物，

其中,所述Hippo信号通路抑制剂为MST1/2激酶抑制剂或大肿瘤抑制激酶(LATS)1/2激酶抑制剂。

[0016] [3]根据[1]或[2]所述的用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,还包括与gp130结合的细胞因子家族。

[0017] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,该类器官为上皮类器官。

[0018] [5]一种类器官的增殖方法,包括在存在Hippo信号通路抑制剂且不存在细胞外基质的条件下培养类器官的工序。

[0019] [6]根据[5]所述的类器官的增殖方法,其中,在无血清条件下进行所述类器官的培养。

[0020] [7]一种类器官,其中,该类器官是通过[5]或[6]所述的增殖方法增殖的。

[0021] [8]一种用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,该药物的有效成分为Hippo信号通路抑制剂。

[0022] [9]根据[8]所述的用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,所述Hippo信号通路抑制剂为MST1/2激酶抑制剂或LATS1/2激酶抑制剂。

[0023] [10]根据[8]或[9]所述的用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,还包括与gp130结合的细胞因子家族。

[0024] [11]根据[8]~[10]中任一项所述的用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,该类器官为上皮类器官。

[0025] [12]一种类器官的制造方法,包括在存在Hippo信号通路抑制剂且不存在细胞外基质的条件下建立类器官的工序。

[0026] [13]根据[12]所述的类器官的制造方法,其中,在存在与gp130结合的细胞因子家族的条件下进行该类器官的建立。

[0027] [14]根据[12]或[13]所述的类器官的制造方法,其中,在无血清条件下进行该类器官的建立。

[0028] [15]一种类器官,其中,该类器官是通过[12]~[14]中任一项所述的制造方法制造的。

[0029] [16]一种再生医疗制剂,其中,该再生医疗制剂的有效成分为[15]所述的类器官。

[0030] [17]一种能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物的筛选方法,包括:在存在待测物质且不存在细胞外基质的条件下培养类器官的工序;以及评估该类器官的增殖的工序;其中,与不存在该待测物质的条件下相比该类器官的增殖较高,表示该待测物质为能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物。

[0031] [发明效果]

[0032] 本发明能提供一种在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的技术。

附图说明

[0033] 图1为说明Hippo信号通路的示意图。

[0034] 图2为实验例1的结果的代表性照片及图。

[0035] 图3为实验例2的结果的代表性照片及图。

- [0036] 图4为实验例3中的蛋白质印迹的结果的代表性照片。
- [0037] 图5为实验例4中的人小肠来源类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0038] 图6为实验例4中的人大肠来源类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0039] 图7为汇总了图5、图6的结果的图。
- [0040] 图8示出了实验例5的结果。
- [0041] 图9为实验例6的结果的代表性照片。
- [0042] 图10示出了实验例7的结果。
- [0043] 图11为实验例8的结果的代表性照片。
- [0044] 图12为实验例9中的类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0045] 图13为实验例10中的类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0046] 图14示出了实验例11的结果。
- [0047] 图15示出了实验例11的结果。
- [0048] 图16示出了实验例12中的定量实时PCR的结果。
- [0049] 图17示出了实验例12中的蛋白质印迹的结果。
- [0050] 图18为实验例13中的类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0051] 图19为实验例13中的类器官的代表性的显微镜照片。
- [0052] 图20为实验例14中的类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0053] 图21为实验例14中的类器官的代表性显微镜照片。
- [0054] 图22示出了实验例15的结果。
- [0055] 图23为实验例16中的类器官的代表性显微镜照片。
- [0056] 图24示出了实验例16的结果。
- [0057] 图25为实验例17中的类器官的免疫染色结果的代表性照片。
- [0058] 图26示出了实验例18的结果。
- [0059] 图27示出了实验例19的结果。
- [0060] 图28示出了实验例20的结果。
- [0061] 图29为实验例21的结果的显微镜照片及图。
- [0062] 图30为说明实验例22的概要的示意图及表示实验例22的结果的图。
- [0063] 图31为说明实验例23的概要的示意图。
- [0064] 图32为实验例23的结果的照片。

具体实施方式

[0065] [用于在不存在细胞外基质的条件下增殖类器官的药物]

[0066] 在一个实施方式中,本发明提供一种用于在不存在细胞外基质的条件下形成并增殖类器官的药物,其中,该药物的有效成分为Hippo信号通路抑制剂。

[0067] 如在实施例中后述的,通过向培养基中添加本实施方式的药物,能在不存细胞外基质的条件下形成并增殖类器官。其中,“增殖”是指构成类器官的细胞的数量增加,也可以说是“培养”。另外,“形成”类器官是指建立类器官、由解离成单细胞的类器官再次形成类器官等。在一个方式中,本实施方式的药物可以是有效成分为Hippo信号通路抑制剂的、用于在不存在细胞外基质的条件下增殖类器官的药物。

[0068] 以往,在不存在细胞外基质的条件下增殖类器官是不可能的。通过本实施方式的药物,可以完全不使用细胞外基质Matrigel(注册商标)等动物源产品使类器官增殖。其中,动物源产品是指源于人或非人动物的成分未鉴定的物质。通过无动物源产品的培养技术有望将类器官应用于再生医疗。另外,从动物保护、成本的观点出发,也比常规类器官培养技术有利。

[0069] 已知Hippo信号通路是一种已知参与细胞增殖、凋亡和干细胞自我更新等的信号通路,是一种进化保守的通路。

[0070] 图1为说明Hippo信号通路的示意图。如图1所示,已知转录因子TEAD通过与辅激活因子YAP(Yes-associated protein)结合,激活参与细胞增殖的基因转录,促进细胞增殖。YAP有磷酸化型和非磷酸型,非磷酸型YAP转移到核中,作为TEAD的转录辅激活因子发挥作用。另一方面,磷酸型YAP与细胞质蛋白质14-3结合,不能转移到核中,因此不能作为辅激活因子发挥作用。因此,决定YAP核转移的磷酸化调控是细胞增殖中非常重要的事件。

[0071] 另外,如图1所示,已知大肿瘤抑制激酶(LATS)将YAP磷酸化,使YAP定位于细胞质中,由此负向调节YAP参与细胞增殖。

[0072] 作为Hippo信号通路抑制剂,只要是抑制上述信号通路的任一阶段的物质都可以使用,不作特别限定。

[0073] 例如,可以是MST1激酶或MST2激酶的抑制剂(MST1/2激酶抑制剂),也可以是LATS1激酶或LATS2激酶的抑制剂(LATS1/2激酶抑制剂)。

[0074] 人MST1激酶的氨基酸序列的NCBI登录号为NP_001380510.1、NP_001380511.1、NP_001380512.1、NP_001380513.1、NP_001380514.1、NP_066278.3等。另外,人MST2激酶的氨基酸序列的NCBI登录号为NP_001243241.1、NP_001243242.1、NP_006272.2等。

[0075] 人LATS1激酶的氨基酸序列的NCBI登录号为NP_001257448.1、NP_001337268.1、NP_001337269.1、NP_001337321.1、NP_004681.1等。另外,人LATS2激酶的氨基酸序列的NCBI登录号为NP_055387.2等。

[0076] 作为更具体的Hippo信号通路抑制剂的例子,例如可以列举作为LATS1激酶和LATS2激酶的抑制剂的Lats-IN-1(CAS号:1424635-83-5,以下可能称为“Lats-IN”。也称为“TRULI”)、GA-017(CAS号:2351906-74-4)、TDI-011536(CAS号:2687970-96-1)等。

[0077] 作为细胞外基质,可以列举Matrigel(注册商标)、胶原蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、层粘连蛋白等。以往,在不存在细胞外基质的条件下增殖类器官是不可能的。

[0078] 在不存在细胞外基质的条件下增殖类器官是指不从外部向类器官的培养基中添加细胞外基质,允许类器官自身产生的微量细胞外基质混入培养基中、或微量细胞外基质意外混入培养基中。在此,微量可以指检测极限程度。

[0079] 在本实施方式的药物中,作为类器官,可以列举上皮类器官,例如可以列举小肠来源类器官、大肠来源类器官、胃来源类器官、胆道来源类器官、胰脏类器官、乳腺来源类器官、肝细胞类器官、肺类器官、呼吸道类器官、食道类器官、唾液腺类器官等。

[0080] 类器官可以是人源类器官,也可以是非人动物源类器官。作为非人动物,可以列举哺乳动物,例如可以列举小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等啮齿类;猪、牛、山羊、马、绵羊等有蹄类;狗、猫等食肉类;普通猕猴、食蟹猴、狨猴、猩猩、黑猩猩等灵长类等。

[0081] 本实施方式的药物添加到类器官培养用培养基中使用。类器官培养用培养基中的

本实施方式的药物的浓度优选为10 μ M以上且60 μ M以下,更优选为10 μ M以上且30 μ M以下。

[0082] 作为类器官培养用培养基,可以列举从常规类器官培养用培养基中去除细胞外基质后的培养基。作为类器官培养用培养基,优选为在基本培养基中添加了下述i)~v)成分中的至少一种的培养基。类器官培养用培养基也可以包含血清,但从优选无动物源产品的观点出发,优选为无血清。

[0083] i) Wnt激动剂

[0084] ii) 选自由胰岛素样生长因子1(Insulin-like growth factor1、IGF1)、成纤维细胞生长因子2(Fibroblast growth factor2、FGF2)、EGF(Epidermal Growth Factor)和表皮调节素(Epiregulin、EREG)、成纤维细胞生长因子10(Fibroblast growth factor10、FGF10)、胃泌素-1所组成的组中的至少一种

[0085] iii) 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein、BMP)抑制剂

[0086] iv) 转化生长因子- β (transforming growth factor- β 、TGF- β)抑制剂

[0087] v) γ 分泌酶抑制剂

[0088] 类器官培养用培养基优选包含选自由IGF1、FGF2、EGF和表皮调节素所组成的组中至少一种。可以适当选择含有IGF1、FGF2、EGF和表皮调节素中的哪一种。类器官培养用培养基优选包含IGF1和表皮调节素、FGF2和表皮调节素、或者IGF1和FGF2,更优选包含IGF1和FGF2。

[0089] 作为基本培养基,可以使用任何无血清的细胞培养基本培养基。例如可以列举用碳酸类缓冲液缓冲至pH7.2以上且pH7.6以下的合成培养基等。更具体而言,可以列举补充有谷氨酰胺、胰岛素、B27补充剂(赛默飞世尔科技公司)N-乙酰-L-半胱氨酸(富士胶片和光纯药)、青霉素、链霉素、转铁蛋白等的高级-杜氏改良Eagle培养基/Ham's F-12混合培养基(DMEM/F12)等。另外,也可以使用RPMI1640培养基、高级RPMI培养基等代替DMEM/F12培养基。

[0090] (Wnt激动剂)

[0091] Wnt激动剂是指在细胞内激活T-细胞因子(以下也称为TCF。)/淋巴增强因子(以下也称为LEF。)介导的转录的药物。因此,Wnt激动剂,不限于Wnt家族蛋白,包括与Frizzled受体家族成员结合激活的Wnt激动剂、细胞内 β -连环蛋白分解抑制剂、TCF/LEF的激活物质。Wnt激动剂优选为选自由Wnt蛋白质、R-spondin和GSK-3 β 抑制剂所组成的组中的至少一种。

[0092] 类器官培养用培养基优选包含Wnt激动剂。作为Wnt激动剂,更优选包含Wnt蛋白质与其稳定化物质Afamin的复合体,进一步优选包含Wnt蛋白质与Afamin的复合体和R-spondin。

[0093] 《Wnt蛋白质》

[0094] 作为Wnt蛋白质,不特别限定其来源,可以使用各种生物源Wnt蛋白质。其中,优选为哺乳动物源Wnt蛋白质。作为哺乳动物,可以列举与上述相同的哺乳动物。作为哺乳动物的Wnt蛋白质,可以列举Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16等。在类器官培养用培养基中,可以组合使用多种Wnt蛋白质。

[0095] 作为制备Wnt蛋白质的方法,例如可以列举使用Wnt蛋白质表达细胞进行制备的方法等。在Wnt蛋白质表达细胞中,不特别限定细胞来源(生物种类、培养形式等),只要是稳定

表达Wnt蛋白质的细胞即可,也可以是瞬时表达Wnt蛋白质的细胞。作为Wnt蛋白质表达细胞,例如可以列举稳定表达小鼠Wnt3a的L细胞(ATCC CRL-2647)、稳定表达小鼠Wnt5a的L细胞(ATCC CRL-2814)等。另外,可以使用公知的基因重组技术来制作Wnt蛋白质表达细胞。即,将编码所需Wnt蛋白质的DNA插入公知的表达载体,将得到的表达载体导入适当的宿主细胞,从而可以制作Wnt蛋白质表达细胞。例如可以从GenBank等公知的数据库获取编码所需Wnt蛋白质的基因的碱基序列。

[0096] 由Wnt蛋白质表达细胞表达的Wnt蛋白质,只要具有Wnt活性,可以是Wnt蛋白质的片段,也可以含有Wnt蛋白质的氨基酸序列以外的氨基酸序列。对Wnt蛋白质的氨基酸序列以外的氨基酸序列没有特别限定,例如可以列举亲和标签的氨基酸序列等。另外,Wnt蛋白质的氨基酸序列不需要与能从GenBank等公知的数据库获取的氨基酸序列完全一致,只要具有Wnt活性,也可以是与能从公知的数据库获取的氨基酸序列实质相同的氨基酸序列。

[0097] 作为与能从GenBank等公知的数据库获取的Wnt蛋白质的氨基酸序列实质相同的氨基酸序列,例如可以列举在能从公知的数据库获取的氨基酸序列中缺失、置换或添加了1至数个氨基酸的氨基酸序列等。

[0098] 缺失、置换或添加1至数个氨基酸的氨基酸序列是指例如通过定点诱变法等公知的突变肽制备法等,删除、置换或添加能够缺失、置换或添加的数量的氨基酸(优选10个以下,更优选7个以下,进一步优选6个以下)。

[0099] 另外,作为实质相同的氨基酸序列,例如可以列举与能从公知数据库获取的氨基酸序列的同源性为至少80%以上、优选为至少85%以上、更优选为至少90%以上、进一步优选为至少92%以上、特别优选为至少95%以上、最优选为至少99%以上的氨基酸序列等。

[0100] Wnt蛋白质的浓度优选为50ng/mL以上,更优选为100ng/mL以上且10 μ g/mL以下,进一步优选为200ng/mL以上且1 μ g/mL以下,特别优选为300ng/mL以上且1 μ g/mL以下。

[0101] 《R-spondin》

[0102] 作为R-spondin,可以列举由R-spondin 1、R-spondin 2、R-spondin 3和R-spondin 4构成的R-spondin家族。已知R-spondin家族是分泌蛋白,与Wnt信号通路的激活和调控有关。在类器官培养用培养基中,可以组合使用多种R-spondin。另外,只要具有R-spondin活性,可以是R-spondin的片段,也可以包含R-spondin的氨基酸序列以外的氨基酸序列。

[0103] 《GSK-3 β 抑制剂》

[0104] 作为GSK-3 β 抑制剂,例如可以列举CHIR-99021(CAS号:252917-06-9)、CHIR-98014(CAS号:252935-94-7)、锂、肯帕罗酮(CAS号:142273-20-9)、6-溴靛玉红-30-丙酮肟、SB216763(CAS号:280744-09-4)、SB415286(CAS号:264218-23-7)、阻止GSK-3与axin相互作用的FRAT家族成员、FRAT源肽等。

[0105] 《Afamin》

[0106] 已知Afamin是指属于白蛋白家族的糖蛋白,存在于血液或体液中。通常添加至培养基的血清中包含采集该血清的动物来源的Afamin。由于血清中包含Afamin以外的杂质等,因此优选不使用血清,单独使用Afamin。

[0107] 对类器官培养用培养基中含有的Afamin的来源不作特别限定,可以使用各种生物源Afamin。其中,优选为哺乳动物源Afamin。作为哺乳动物,可以列举与上述相同的哺乳动

物。例如可以从GenBank等公知数据库中获取主要哺乳动物的Afamin的氨基酸序列和编码其基因的碱基序列。例如,在GenBank中,人Afamin的氨基酸序列的登录号为AAA21612、编码其基因的碱基序列的登录号为L32140,牛Afamin的氨基酸序列的登录号为DAA28569、编码其基因的碱基序列的登录号为GJ060968。

[0108] 类器官培养用培养基中含有的Afamin可以通过公知方法对血清等中含有的天然Afamin进行纯化得到的,也可以是重组Afamin。重组Afamin可以通过适当使用公知基因重组技术制造的。

[0109] 重组Afamin的制造方法为例如如下制造方法:可以通过将编码Afamin的DNA插入公知表达载体,将得到的表达载体导入适当宿主细胞以表达重组Afamin,使用公知纯化方法进行纯化。重组Afamin可以是添加了亲和标签的Afamin。对添加的亲和标签不作特别限定,可以从公知亲和标签中适当选择使用。亲和标签,优选为由特异性抗体识别的亲和标签,例如可以列举FLAG标签、MYC标签、HA标签、V5标签等。

[0110] 上述Wnt蛋白质,由于特定丝氨酸残基被脂肪酸(棕榈油酸)修饰,具有强疏水性。因此,已知Wnt蛋白质在水溶液中容易凝聚或变性,纯化和保存非常困难。

[0111] 另一方面,已报导,脂肪酸对该特定丝氨酸残基的修饰对于Wnt蛋白质的生理活性是必须的,参与其与Frizzled受体家族成员的结合。

[0112] 另外,已知在水溶液中,Wnt蛋白质与Afamin一对一地结合形成复合体,在保持高生理活性的同时可溶解。可以通过培养表达Wnt蛋白质和Afamin两者的细胞的方法制造Wnt蛋白质-Afamin复合体,也可以通过共同培养Wnt蛋白质表达细胞和Afamin表达细胞的方法制造Wnt蛋白质-Afamin复合体。

[0113] 对类器官培养用培养基中含有的Afamin的浓度不作特别限定,优选为50ng/mL以上且10 μ g/mL以下,更优选为100ng/mL以上且1 μ g/mL以下,进一步优选为300 μ g/mL以上且1 μ g/mL以下。

[0114] (IGF1)

[0115] IGF1也被称为别名促生长因子C,主要是在肝脏中由生长激素(GH)刺激而分泌的因子。已知人体的大多数细胞(特别是肌肉、骨、肝脏、肾脏、神经、皮肤及肺等的细胞)都受IGF1的影响。IGF1除了胰岛素样效果以外,还具有调节细胞(特别是神经细胞)生长、发育、细胞DNA合成的功能。

[0116] 对类器官培养用培养基中含有的IGF1的浓度不作特别限定,优选为5ng/mL以上且1 μ g/mL以下,更优选为10ng/mL以上且1 μ g/mL以下,进一步优选为50ng/mL以上且500ng/mL以下。

[0117] (FGF2)

[0118] FGF2是碱性成纤维细胞生长因子,与成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor,FGFR)结合,具有促进血管内皮细胞增殖和向筒状结构组织化、即促进血管新生的功能。另外,已知人FGF2具有低分子量型(LWL)和高分子量型(HWL)两种同源异构体(isoform)。LWL主要存在于细胞质中,通过自身分泌(自分泌)发挥作用,而HWL位于核内,显示出在细胞内发挥作用的胞内分泌机制中的活性。

[0119] 对类器官培养用培养基中含有的FGF2的浓度不作特别限定,优选为5ng/mL以上且500 μ g/mL以下,更优选为10ng/mL以上且300 μ g/mL以下,进一步优选为50ng/mL以上且100 μ

g/mL以下。

[0120] (FGF10)

[0121] FGF10主要从间质组织分泌,通过FGFR2b作用于上皮,是在各种组织形成、修复中承担重要上皮间质相互作用的分子。

[0122] 对类器官培养用培养基中含有的FGF10的浓度不作特别限定,优选为5ng/mL以上且1 μ g/mL以下,更优选为10ng/mL以上且1 μ g/mL以下,进一步优选为30ng/mL以上且500ng/mL以下。

[0123] (EGF)

[0124] EGF是针对各种培养外胚层细胞和中胚层细胞的强分裂促进因子,对某些成纤维细胞的特异性细胞分化具有显著影响。EGF前体,以膜结合分子的形式存在,通过蛋白质分解被切断、生成刺激细胞的53-氨基酸肽激素。

[0125] 类器官培养用培养基中含有的EGF的浓度优选为5ng/mL以上且500ng/mL以下,更优选为10ng/mL以上且400ng/mL以下,进一步优选为50ng/mL以上且200ng/mL以下。

[0126] (EREG)

[0127] EREG是酪氨酸激酶 (ErbB) 家族受体 (ErbB1 ~ 4) 中的与ErbB1和ErbB4特异性结合的EGF样生长因子。已知其刺激角质形成细胞、肝细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞增殖。另外,EREG主要在膀胱、肺、肾脏、大肠等的恶性肿瘤、胎盘以及外周血白细胞中表达。

[0128] 对类器官培养用培养基中含有的EREG的浓度不作特别限定,优选为5ng/mL以上且1 μ g/mL以下,更优选为10ng/mL以上且1 μ g/mL以下,进一步优选为50ng/mL以上且500ng/mL以下。

[0129] (BMP抑制剂)

[0130] BMP,作为二聚体配体,与由两种不同受体丝氨酸/苏氨酸激酶、I型和II型受体组成的受体复合体结合。II型受体磷酸化I型受体,从而激活该受体激酶。接着该I型受体磷酸化特异受体底物(SMAD),从而通过信号通路引导转录活性。通常,BMP抑制剂,例如,是阻止或抑制BMP分子与BMP受体结合的药物,是为了形成中和BMP活性的复合体而与BMP分子结合的药物。另外,BMP抑制剂,例如,是与BMP受体结合阻止或抑制BMP分子与受体的结合的药物,是作为拮抗剂或反向激动剂发挥作用的药物。

[0131] BMP抑制剂,与在无该抑制剂的条件下的BMP活性水平相比,具有优选50%以上、更优选70%以上、进一步优选80%以上、特别优选90%以上的抑制活性。

[0132] BMP抑制剂优选为天然BMP结合蛋白质,例如可以列举头蛋白(Noggin)、Gremlin、Chordin、Chordin结构域等Chordin样蛋白质;卵泡抑素(Follistatin)、卵泡抑素结构域等卵泡抑素相关蛋白质;DAN、DAN胱氨酸结构域等DAN样蛋白质;骨硬化蛋白(Sclerostin)/SOST、核心蛋白聚糖(Decorin)、 α -2巨球蛋白等。

[0133] 类器官培养用培养基中含有的BMP抑制剂,其中,优选为Chordin样蛋白质或DAN样蛋白质,更优选为Chordin样蛋白质。Chordin样蛋白质,优选为头蛋白(Noggin)。Chordin样蛋白质和DAN样蛋白质是扩散性蛋白质,可以各种亲和力结合BMP分子,抑制BMP分子接近信号传导受体。在培养上皮干细胞时,通过在类器官培养用培养基中添加这些BMP抑制剂,能防止干细胞损失。

[0134] 类器官培养用培养基中含有的BMP抑制剂的浓度优选为10ng/mL以上且100ng/mL

以下,更优选为20ng/mL以上且100ng/mL以下,进一步优选为50ng/mL以上且100ng/mL以下。

[0135] (TGF- β 抑制剂)

[0136] TGF- β 是生长因子的一种,由肾脏、骨髓、血小板等几乎所有的细胞产生。TGF- β 中存在5种亚型(β 1~ β 5)。另外,已知TGF- β 促进成骨细胞增殖以及胶原蛋白这样的结缔组织合成和增殖,对上皮细胞增殖、破骨细胞发挥抑制作用。通常,TGF- β 抑制剂是,例如阻止或抑制TGF- β 与TGF- β 受体的结合的药物的,是为了形成中和TGF- β 活性的复合体与TGF- β 结合的药物的。另外,TGF- β 抑制剂是,例如与TGF- β 受体结合而阻止或抑制TGF- β 与受体结合的药物的,是作为拮抗剂或反向激动剂发挥作用的药物的。

[0137] 作为TGF- β 抑制剂,例如可以列举A83-01(CAS号:909910-43-6)、ALK5抑制剂I(3-(吡啶-2-基)-4-(4-醌基)-1H-吡唑)、LDN193189(CAS号:1062368-24-4)、SB-431542(CAS号:301836-41-9)、SB-505124(CAS号:694433-59-5)、SD-208(CAS号:627536-09-8)、SB-525334(CAS号:356559-20-1)、LY364947(CAS号:396129-53-6)、LY2157299(CAS号:700874-72-2)、TGF- β RI激酶抑制剂II 616452(CAS号:446859-33-2)、TGF- β RI激酶抑制剂III 616453(CAS号:356559-13-2)、TGF- β RI激酶抑制剂IX 616463(4-((4-((2,6-二甲基吡啶-3-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)苯磺酰胺)、TGF- β RI激酶抑制剂VII 616458(CAS号:666729-57-3)、TGF- β RI激酶抑制剂VIII 616459(CAS号:356559-20-1)、AP12009(TGF- β 2反义化合物“Trabedersen”)、Belagenpumatucel-L(TGF- β 2反义基因修饰同种异系肿瘤细胞疫苗)、CAT-152(Glaucoma-1erdelimumab(抗-TGF- β -2单克隆抗体))、CAT-192(CAT Metelimumab(中和TGF β 1的人IgG4单克隆抗体)、GC-1008(抗-TGF- β 单克隆抗体)等。TGF- β 抑制剂优选为A83-01。

[0138] 类器官培养用培养基中含有的TGF- β 抑制剂的浓度优选为100nM以上且10 μ M以下,更优选为500nM以上且5 μ M以下,进一步优选为500nM以上且2 μ M以下。

[0139] (γ 分泌酶抑制剂)

[0140] 作为 γ 分泌酶,例如可以列举BMS299897(CAS号:290315-45-6)、DAPT(CAS号:208255-80-5)、DBZ(CAS号:209984-56-5)、JLK6(CAS号:62252-26-0)、L-685458(CAS号:292632-98-5)、LY411575(CAS号:209984-57-6)等。其中,优选为LY411575。

[0141] 类器官培养用培养基中含有的 γ 分泌酶抑制剂的浓度优选为1nM以上且10 μ M以下,更优选为100nM以上且1 μ M以下。

[0142] (其他成分)

[0143] 类器官培养用培养基还可以包含Rho-激酶(Rock)抑制剂。作为Rock抑制剂,例如可以列举Y-27632(CAS号:129830-38-2)、法舒地尔(HA1077)(CAS号:103745-39-7)、H-1152(CAS号:871543-07-6)等。使用Y-27632作为Rock抑制剂时,优选在分散成单细胞的干细胞培养的最初约2天添加。类器官培养用培养基中含有的Y-27632优选为约10 μ M。

[0144] 在类器官为肝细胞类器官的情况下,类器官培养用培养基优选进一步包含与gp130结合的细胞因子家族的细胞因子,例如抑瘤素M。类器官培养用培养基中含有的抑瘤素M的浓度例如可以为1ng/mL以上且10 μ g/mL以下,例如可以为1ng/mL以上且1 μ g/mL以下,例如可以为5ng/mL以上且100ng/mL以下。

[0145] 类器官培养用培养基可以进一步添加胃泌素(或Leu15-胃泌素等适当替代物)。类器官培养用培养基中含有的胃泌素或适当替代物的浓度例如可以为1ng/mL以上且10 μ g/mL

以下,例如可以为1ng/mL以上且1 μ g/mL以下,例如可以为5ng/mL以上且100ng/mL以下。

[0146] 类器官培养用培养基可以进一步包含至少一种氨基酸。作为氨基酸,例如可以列举L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸及它们的组合。类器官培养用培养基中含有的L-谷氨酰胺的浓度为0.05g/L以上且1g/L以下(通常为0.1g/L以上且0.75g/L以下)。类器官培养用培养基中含有的其他氨基酸为0.001g/L以上且1g/L以下(通常为0.01g/L以上且0.15g/L以下)。氨基酸也可以是合成的。

[0147] 类器官培养用培养基可以进一步包含至少一种维生素。作为维生素,例如可以列举硫胺素(维生素B1)、核黄素(维生素B2)、烟酸(维生素B3)、D-泛酸钙(维生素B5)、吡哆醛/吡哆胺/吡哆醇(维生素B6)、叶酸(维生素B9)、氰钴胺素(维生素B12)、抗坏血酸(维生素C)、钙化醇(维生素D2)、DL- α 生育酚(维生素E)、生物素(维生素H)和甲萘醌(维生素K)。

[0148] 类器官培养用培养基可以进一步包含至少一种无机盐。无机盐有助于维持细胞的渗透压平衡以及帮助调节膜电位。作为无机盐的具体例,可以列举钙盐、铜盐、铁盐、镁盐、钾盐、钠盐、锌盐。盐通常以氯化物、磷酸盐、硫酸盐、硝酸盐和碳酸氢盐的形式使用。更具体的盐可以列举CaCl₂、CuSO₄·5H₂O、Fe(NO₃)₃·9H₂O、FeSO₄·7H₂O、MgCl₂、MgSO₄·KCl、NaHCO₃、NaCl、Na₂HPO₄、Na₂HPO₄·H₂O、ZnSO₄·7H₂O等。

[0149] 类器官培养用培养基可以进一步包含至少一种可作为碳能量源的糖。作为糖,例如可以列举葡萄糖、半乳糖、麦芽糖和果糖。其中,优选为葡萄糖,特别优选为D-葡萄糖(右旋糖)。类器官培养用培养基中含有的糖的浓度优选为1g/L以上且10g/L以下。

[0150] 类器官培养用培养基可以进一步包含至少一种微量元素。作为微量元素,例如可以列举钡、溴、钴、碘、锰、铬、铜、镍、硒、钒、钛、锗、钼、硅、铁、氟、银、铷、锡、锆、镉、锌、铝或它们的离子等。

[0151] 类器官培养用培养基可以进一步包含至少一种额外的药物。作为该药物,可以列举被报道改善干细胞培养的营养素或生长因子,例如胆固醇、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、孕酮、腐胺、亚硒酸盐等。

[0152] [类器官的增殖方法]

[0153] 在一个实施方式中,本发明提供一种类器官的增殖方法,包括在存在Hippo信号通路抑制剂且不存在细胞外基质的条件下培养类器官的工序。本实施方式的类器官的增殖方法也可以说是类器官的制造方法。

[0154] 如在实施例后述的,通过本实施方式的方法,能在不存在细胞外基质的条件下增殖类器官。其中,“增殖”是指构成类器官的细胞的数量增加,也可以说是“培养”。

[0155] 在本实施方式的方法中,Hippo信号通路抑制剂、细胞外基质、类器官等与上述相同。即,在本实施方式的方法中,Hippo信号通路抑制剂优选为MST1/2激酶抑制剂或LATS1/2激酶抑制剂。另外,在本实施方式的方法中,类器官优选为上皮类器官。

[0156] 在本实施方式的方法中,也可以在无血清条件下进行类器官的培养。通过在不存在细胞外基质且无血清的条件下使类器官增殖,可以得到完全不使用动物源产品制造的类器官。

[0157] [类器官]

- [0158] 在一个实施方式中,本发明提供一种通过上述增殖方法增殖的类器官。
- [0159] 本实施方式的类器官是以无动物源产品的方式制作的。因此,容易应用于再生医疗。
- [0160] 本实施方式的类器官可以是消化道类器官。在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的常规消化道类器官呈球形,保持顶端极性的单层上皮细胞薄片的内侧为顶端侧。
- [0161] 相反,如在实施例后述的,本实施方式的类器官是细胞多层化的球形形态,未保持上皮细胞的顶端极性,与在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的常规消化道类器官的形态不同。
- [0162] 据认为本实施方式的类器官与常规类器官在基因表达模式等方面存在差异。然而,是否能证实基因表达模式中的差异并明确地判断是常规类器官还是本实施方式的类器官是未知的、不现实的。因此,据认为通过其制造方法来规定本实施方式的类器官是切实的。
- [0163] [用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物]
- [0164] 在一个实施方式中,本发明提供一种用于在不存在细胞外基质的条件下建立类器官的药物,其中,该药物的有效成分为Hippo信号通路抑制剂。
- [0165] 如上所述,发明人发现,通过在培养基中添加Hippo信号通路抑制剂,能不存在细胞外基质的条件下增殖类器官。然而,虽说已建立的类器官能增殖,但不能说通过在培养基中添加Hippo信号通路抑制剂,就能从生物源组织建立类器官。
- [0166] 相反,如在实施例后述的,发明人发现,通过将本实施方式的药物添加到培养基中,在不存在细胞外基质的条件下,可以从生物源组织建立类器官,另外,不使用细胞外基质也可以从单细胞建立类器官。
- [0167] 在本实施方式的药物中,Hippo信号通路抑制剂、细胞外基质、类器官等与上述相同。即,在本实施方式的方法中,Hippo信号通路抑制剂优选为MST1/2激酶抑制剂或LATS1/2激酶抑制剂。另外,在本实施方式的药物中,类器官优选为上皮类器官。
- [0168] [类器官的制造方法]
- [0169] 在一个实施方式中,本发明提供了类器官的制造方法,包括在存在Hippo信号通路抑制剂且不存在细胞外基质的条件下建立类器官的工序。本实施方式的类器官的制造方法也可以说是类器官的建立方法。
- [0170] 如在实施例后述的,通过本实施方式的方法,在不存在细胞外基质的条件下,可以从生物体组织建立类器官,另外,不使用细胞外基质也可以从单细胞建立类器官。进一步地,根据本实施方式的方法,也可以在没有血清条件下进行类器官的建立。通过不存在细胞外基质且无血清的条件下建立类器官,可以得到从建立时起以无动物源产品方式制作的类器官。
- [0171] 在本实施方式的方法中,Hippo信号通路抑制剂、细胞外基质、类器官等与上述相同。即,在本实施方式的制造方法中,Hippo信号通路抑制剂优选为MST1/2激酶抑制剂或LATS1/2激酶抑制剂。另外,在本实施方式的制造方法中,类器官优选为上皮类器官。
- [0172] [类器官]
- [0173] 在一个实施方式中,本发明提供了一种通过上述制造方法制造的类器官。
- [0174] 如在实施例后述的,发明人发现,通过上述制造方法,在不存在细胞外基质的条

件下可以从生物源组织建立类器官,另外在不使用细胞外基质时也能从单细胞建立类器官。本实施方式的类器官,特别是在无血清条件下建立时,是从建立时起以无动物源产品方式得到的。因此,特别容易移植至生物体,应用于再生医疗。因此,在一个实施方式中,本发明提供了有效成分为通过上述制造方法制造的类器官的再生医疗制剂。

[0175] 据认为本实施方式的类器官与常规类器官在基因表达模式等方面存在差异。然而,是否能证实基因表达模式中的差异并明确地判断是常规类器官还是本实施方式的类器官是未知的、不现实的。因此,据认为通过其制造方法来规定本实施方式的类器官是切实的。

[0176] [能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物的筛选方法]

[0177] 在一个实施方式中,本发明提供了能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物的筛选方法,包括:在存在待测物质且不存在细胞外基质的条件下培养类器官的工序;以及评估该类器官的增殖的工序;其中,与在无该待测物质的条件下相比该类器官的增殖较高,表示该待测物质为能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物。

[0178] 通过本实施方式的筛选方法,可以筛选出能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物。

[0179] 在本实施方式的筛选方法中,细胞外基质、类器官等与上述相同。

[0180] 在本实施方式的筛选方法中,对于待测物质不作特别限定,例如可以使用天然化合物库、合成化合物库、现有药库等。

[0181] 可以通过适当的方法,例如可以列举基于显微镜观察的细胞数测定、基于测定ATP的细胞数测定、基于MTT等四唑(Tetrazolium)化合物的细胞数测定的评估等,进行类器官的增殖的评估。当与在无待测物质的条件下相比类器官的增殖较高时,可以判断待测物质为能在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的药物。

[0182] [实施例]

[0183] 下面示出实施例来更详细地说明本发明,但本发明并不限定于以下的实施例。

[0184] [实验例1]

[0185] (在有LATS激酶抑制剂的条件下的类器官培养1)

[0186] 在有LATS1激酶和LATS2激酶的抑制剂Lats-IN-1(CAS号:1424635-83-5,以下可能称为“Lats-IN”。也称为“TRULI”。)的条件下培养人小肠来源类器官和人大肠来源类器官,观察其动态。

[0187] 人小肠来源类器官和人大肠来源类器官是根据由庆应义塾大学医学部伦理委员会批准的伦理研究计划、由得到说明和同意的消化器官肿瘤患者来源的组织建立的类器官。

[0188] 使用TrypLE Express(赛默飞世尔科技)将各类器官解离成单细胞,得到细胞悬浮液。接着,将 1×10^5 个/孔的细胞与25 μ L Matrigel(注册商标)一起接种于48孔板。然后,待Matrigel(注册商标)凝胶化后,每孔添加100 μ L下述表1所示组成的培养基,在37 $^{\circ}$ C培养。在试验组的培养基中添加10mM Lats-IN。之后,每2天更换培养基。

[0189] [表1]

培养基的组成	
	高级 DMEM/F-12 培养基
	10mM HEPES
	2mM GlutaMAX
	100U/mL 青霉素/100 μ g/mL 链霉素(赛默飞世尔科技)
	1mM N-乙酰半胱氨酸(富士胶片和光纯药)
	1 \times B27(赛默飞世尔科技)
	10nM 胃泌素 I(Sigma-Aldrich)
[0190]	5% Afamin-Wnt-3A 无血清条件培养基
	50ng/mL 重组 EGF 小鼠(赛默飞世尔科技)
	100ng/mL 重组头蛋白小鼠(PeproTech)
	10%R-spondin1 条件培养基
	10nM A83-01(R&D 系统)
	10 μ M Y-27632(富士胶片和光纯药)
	50 μ g/mL 人 FGF-2(PeproTech)
	50ng/mL 人 FGF-10(PeproTech)
	100 μ g/mL 人 IGF-1(BioLegend)

[0191] 图2为培养7天后的各类器官的代表性照片及显示细胞数的图。图2上部分示出从小肠来源类器官的结果,图2下部分示出人大肠来源类器官的结果。通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定三磷酸腺苷(ATP)来测定细胞增殖。

[0192] 图2上部分左侧是在无Lats-1N的条件下培养的对照(Ctrl)人小肠来源类器官的照片,图2上部分中央是在有Lats-1N的条件下培养的人小肠来源类器官的照片。比例尺为200 μ m。图2上部分右侧示出了对照(Ctrl)及在有Lats-1N的条件下培养的人小肠来源类器官的每孔细胞数的测定结果。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。

[0193] 图2下部分左侧是在无Lats-1N的条件下培养的对照(Ctrl)人大肠来源类器官的照片,图2下部分中央是在有Lats-1N的条件下培养的人大肠来源类器官的照片。比例尺为200 μ m。图2下部分右侧示出了对照(Ctrl)及在有Lats-1N的条件下培养的人大肠来源类器官的每孔细胞数的测定结果。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。

[0194] 结果表明,通过向培养基中添加LATS激酶抑制剂,人小肠来源类器官、人大肠来源类器官的细胞增殖均显著激活。

[0195] [实验例2]

[0196] (在有LATS激酶抑制剂的条件下的类器官培养2)

[0197] 以往,在类器官培养中需要Matrigel(注册商标)等细胞外基质,而使用Matrigel(注册商标)的替代物质难以充分维持细胞增殖、分化。

[0198] 另外,在完全没有Matrigel(注册商标)等细胞外基质的条件下对细胞进行三维培养时,细胞会凝集成为细胞块,在该状态下细胞增殖的活性非常低,完全不可能进行持久传代。

[0199] 本实验例中,在无Matrigel(注册商标)且有LATS激酶抑制剂(终浓度10 μ M)的条件下,对在有Matrigel(注册商标)的条件下建立的人小肠来源类器官和人大肠来源类器官进行培养,观察其动态。除了在无Matrigel(注册商标)的条件下培养各类器官以外,与实验例

1相同。

[0200] 图3为培养7天后的各类器官的代表性照片及显示细胞数的图。图3上部分示出了人小肠来源类器官的结果,图3下部分示出了人大肠来源类器官的结果。

[0201] 图3上部分左侧是在无Lats-IN的条件下培养的对照(Ctrl)人小肠来源类器官的照片,图3上部分中央是在有Lats-IN的条件下培养的人小肠来源类器官的照片。比例尺为100 μ m。图3上部分右侧示出了对照(Ctrl)及在有Lats-IN的条件下培养的人小肠来源类器官的细胞数的测定结果,该结果通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP来测定。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。

[0202] 图3下部分左侧是在无Lats-IN的条件下培养的对照(Ctrl)人大肠来源类器官的照片,图3下部分中央是在有Lats-IN的条件下培养的人大肠来源类器官的照片。比例尺为100 μ m。图3下部分右侧示出了对照(Ctrl)及在有Lats-IN的条件下培养的人大肠来源类器官的细胞数的测定结果。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。

[0203] 结果表明,通过向培养基中添加LATS激酶抑制剂,在无Matrigel(注册商标)的条件下,也均显著激活人小肠来源类器官、人肠源类器官的细胞增殖。在之前据认为在无Matrigel(注册商标)的条件下的类器官增殖是不可能的,但现在变成可能,这是令人惊讶的结果。

[0204] [实验例3]

[0205] (YAP磷酸化的研究)

[0206] 在无或有Matrigel(注册商标)、且无或有LATS激酶抑制剂(终浓度10 μ M)的条件下,培养人小肠来源类器官,通过蛋白质印迹证实YAP磷酸化。

[0207] 图4示出了蛋白质印迹结果的代表性照片。图4中,“pYAP”表示磷酸化YAP,“YAP”表示总YAP(磷酸化YAP和非磷酸化YAP的合计)。使用phospho-YAP(Ser127)(#4911,Cell Signaling Technology)作为针对磷酸化YAP的抗体。使用total-YAP(#14074,Cell Signaling Technology)作为针对总YAP的抗体。

[0208] 结果证实,无论在有还是无Matrigel(注册商标)的条件下,在有Lats-IN时,与在无Lats-IN时相比,YAP的磷酸化被显著抑制。

[0209] [实验例4]

[0210] (免疫染色研究)

[0211] 在无或有Matrigel(注册商标)、且无或有LATS激酶抑制剂(终浓度10 μ M)的条件下,与实验例2一样,培养人小肠来源类器官和人大肠来源类器官。接着,进行免疫染色,确定YAP定位。另外,检测作为细胞增殖标记物的Ki67,证实增殖细胞。

[0212] 图5最左栏是在有Matrigel(注册商标)且无Lats-IN的条件下(Ctrl)培养的人小肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核(Nuc)的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核(Nuc)的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0213] 图5从左数第二栏是在有Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下培养的人小肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核(Nuc)的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,

上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。比例尺表示50 μ m。

[0214] 图5从左数第三栏是在无Matrigel (注册商标) 且无Lats-IN的条件下 (Ctrl) 培养的人小肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核 (Nuc) 的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0215] 图5最右栏示出了在无Matrigel (注册商标) 且有Lats-IN的条件下培养的人小肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核 (Nuc) 的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0216] 图6最左栏是在有Matrigel (注册商标) 且无Lats-IN的条件下 (Ctrl) 培养的人大肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核 (Nuc) 的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0217] 图6从左数第二栏是在有Matrigel (注册商标) 且有Lats-IN的条件下培养的人大肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核 (Nuc) 的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0218] 图6从左数第三栏是在无Matrigel (注册商标) 且无Lats-IN的条件下 (Ctrl) 培养的人大肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核 (Nuc) 的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0219] 图6最右栏是在无Matrigel (注册商标) 且有Lats-IN的条件下培养的人大肠来源类器官的免疫染色结果的照片。最上部分是将Ki67、YAP以及核 (Nuc) 的检测结果合并后的图像,上数第二部分示出了Ki67的检测结果,上数第三部分示出了YAP的检测结果,上数第四部分示出了核 (Nuc) 的检测结果。上数第二部分、第三部分、第四部分的视野与最上部分的四边形包围的区域对应。

[0220] 图7是汇总了图5、图6的结果的图。结果表明,无论在有还是无Matrigel (注册商标) 的条件下,在无Lats-IN时,YAP定位于细胞质中,对表示细胞增殖的Ki67阳性细胞数进行计数的结果显示,Ki67阳性细胞的比例为全部细胞的10%左右。相反,无论在有还是无Matrigel (注册商标) 的条件下,在有Lats-IN时,对YAP定位于核内的细胞数进行计数的结果显示,YAP定位于核内的细胞的比例为全部细胞的约50~80%,Ki67阳性细胞的比例为全部细胞的约50%以上。

[0221] 以上结果表明,通过添加Lats-IN,抑制了LATS,抑制了YAP磷酸化,YAP转移至核,

激活了细胞增殖。

[0222] [实验例5]

[0223] (TEAD的转录活性的研究)

[0224] 研究了通过添加Lats-IN转移至核的YAP是否辅助TEAD的转录活性。具体地,在无Matrigel(注册商标)、且无或有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下培养人小肠来源类器官和人大肠来源类器官,观察使用TEAD抑制剂MYF01-37(CAS号:2416417-65-5)抑制TEAD时的细胞增殖。

[0225] 图8示出了在无Lats-IN(Ctrl)的条件下、在有Lats-IN(Lats-IN)的条件下、在有Lats-IN和MYF01-37(Lats-IN+MYF)的条件下、在有MYF01-37(MYF)的条件下的人小肠来源类器官和人大肠来源类器官的增殖的测定结果。通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP来测定细胞增殖。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。

[0226] 结果表明,在任意的类器官中,在添加Lats-IN的组中细胞增殖被激活,但在添加Lats-IN和MYF01-37两者的组中细胞增殖被抑制。

[0227] 该结果表明,由于添加Lats-IN抑制了LATS功能,YAP转移至核,转移至核的YAP辅助TEAD的转录活性。也就是说,该结果表明,由于向培养基中添加Lats-IN,通过LATS抑制、YAP核转移、通过TEAD促进细胞生长因子转录活性的途径,使在无Matrigel(注册商标)的条件下的细胞增殖成为可能,而在以往这是不可能的。

[0228] [实验例6]

[0229] (从单细胞形成类器官的研究)

[0230] 研究了在无Matrigel(注册商标)的条件下能否从单细胞形成类器官。一直认为细胞-基质间相互作用对于细胞的生存、增殖是必须的,但在无Matrigel(注册商标)的条件下的培养中不存在细胞-基质间相互作用。由此可知,来自细胞-基质间相互作用的信号不参与基于LATS抑制的YAP-TEAD转录调控。

[0231] 除了细胞-基质间相互作用以外,细胞与细胞间(细胞间相互作用)的信号也被认为在细胞的存活、增殖中发挥重要作用。

[0232] 因此,为了研究细胞间相互作用的信号是否通过基于LATS抑制的YAP-TEAD转录调控参与细胞增殖,将人小肠来源类器官解离成单细胞之后,观察从单细胞形成类器官。

[0233] 图9示出了在有或无Matrigel(注册商标)、且无或有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下,从单细胞形成类器官的结果的代表性照片。图9中,箭头表示细胞或类器官。另外,D1、D4、D7分别表示培养开始后第一天、第四天、第七天。图9下部分的括号内,分母表示接种的单细胞的数量,分子表示形成的类器官的数量。另外,还示出了接种的单细胞中形成类器官的细胞的比例(%)。

[0234] 结果表明,在无Matrigel(注册商标)且无Lats-IN的条件下,细胞几乎不增殖。相反,结果表明在有Matrigel(注册商标)的条件下以及无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下,细胞从单细胞增殖,形成了类器官。另外,还表明在有Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下,与在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下相比,形成类器官的细胞的比例更高。

[0235] 由以上结果来看,细胞间相互作用的信号不参与基于LATS抑制的YAP-TEAD转录调

控,基于LATS抑制的YAP-TEAD转录调控通过其信号单独激活细胞增殖,与类器官形成相关。

[0236] [实验例7]

[0237] (在无Matrigel(注册商标)的条件下的类器官建立)

[0238] 研究了在无Matrigel(注册商标)的条件下,能否从人下消化道建立类器官。

[0239] 从小肠源组织及大肠源组织中分离隐窝。在无Matrigel(注册商标)、且无或有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下培养分离的隐窝。

[0240] 图10示出了随时间推移测定的从人大肠源组织分离的隐窝的增殖结果。通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP来测定细胞增殖。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。如图10所示,在无Lats-IN的条件下,分离出的隐窝增加至足以进行1次传代,但之后逐渐凋亡,在第二次传代后完全死亡。

[0241] 相反,在有Lats-IN的条件下,分离出的隐窝,不会停止细胞增殖,几乎可以持久地传代。在从小肠来源组织分离的隐窝中,也得到了同样的结果。

[0242] 这些结果表明,在有Lats-IN的条件下,LATS被抑制,通过YAP引起细胞增殖,即使在无Matrigel(注册商标)的条件下也可以建立类器官。

[0243] [实验例8]

[0244] (来源于各种脏器的类器官的培养)

[0245] 研究了在无Matrigel(注册商标)、且无Lats-IN或有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下是否可以各种脏器来源类器官的培养。

[0246] 图11示出了在无Matrigel(注册商标)且无Lats-IN的条件下(Ctrl)、或在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下(Lats-IN)胃来源类器官、胆道来源类器官、乳腺来源类器官的培养结果的代表性照片。比例尺为100 μ m。

[0247] 结果表明,即使在无Matrigel(注册商标)的条件下,在有Lats-IN时,也会激活细胞增殖,不仅可以培养人下消化道来源类器官,还可以培养任意脏器来源类器官。

[0248] [实验例9]

[0249] (类器官形态的研究1)

[0250] 在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下培养在有Matrigel(注册商标)的条件下建立的人下消化道类器官,观察形态及性质。

[0251] 图12上部分是对小肠来源类器官免疫染色的代表性照片。图12下部分是对人大肠来源类器官免疫染色的代表性照片。图12中,比例尺表示50 μ m。

[0252] 在免疫染色中,检测基底膜标记物整联蛋白 β 4(Int β 4)、顶端侧标记物Ezrin、细胞间粘附标记物 β -连环蛋白(β Cat)、潘氏细胞标记物Lysozyme、胚胎细胞标记物Mucin2(MUC2)、肠道内分泌细胞标记物ChromograninA(CHGA)、核(Nuc)。另外,通过导入至细胞的Lgr5基因座的荧光蛋白TdTomato的荧光,检测作为干细胞标记物的Lgr5的表达。

[0253] 在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的常规人下消化道类器官呈球形,保持顶端极性的单层的上皮细胞薄片的内侧为顶端侧,一个类器官内包含干细胞、胚胎细胞、肠道内分泌细胞等分化细胞。

[0254] 相反,如图12所示,在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下培养的人下消化道类器官是细胞多层化的球形形态,未保持上皮细胞的顶端极性,与在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的常规人下消化道类器官的形态大不相同。

[0255] 然而,如图12所示,在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下培养的人下消化道类器官,不仅证实作为干细胞标记物的Lgr5的表达,还证实潘氏细胞标记物Lysozyme、胚胎细胞标记物Mucin2、肠道内分泌细胞标记物ChromograninA的表达,与在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的常规人下消化道类器官一样,一个类器官内包含干细胞和分化细胞。

[0256] [实验例10]

[0257] (类器官形态的研究2)

[0258] 在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下对在有Matrigel(注册商标)的条件下建立的人下消化道类器官进行传代培养7代,之后再次在有Matrigel(注册商标)的条件下进行培养,观察形态和性质。

[0259] 图13上部分是对人小肠来源类器官进行免疫染色的代表性照片。图13下部分是对人大肠来源类器官进行免疫染色的代表性照片。图13中,比例尺表示50 μ m。

[0260] 在免疫染色中,检测基底膜标记物整联蛋白 β 4(Int β 4)、顶端侧标记物Ezrin、细胞间粘附标记物 β -连环蛋白(β Cat)、潘氏细胞标记物Lysozyme、胚胎细胞标记物Mucin2(MUC2)、肠道内分泌细胞标记物ChromograninA(CHGA)、核(Nuc)。另外,通过导入至细胞的Lgr5基因座的荧光蛋白TdTomato的荧光,检测作为干细胞标记物的Lgr5的表达。

[0261] 结果表明,如图13所示,即使是在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN的条件下培养的人下消化道类器官,若再次在有Matrigel(注册商标)的条件下培养,仍呈球形,保持顶端极性的单层的上皮细胞薄片的内侧为顶端侧,一个类器官内包含干细胞、胚胎细胞、肠道内分泌细胞等分化细胞。

[0262] 该结果表明,即使是在无Matrigel(注册商标)的条件下长期培养,人下消化道上皮细胞的性质仍保持不变。

[0263] [实验例11]

[0264] (类器官培养所必需的微环境(niche)因子的研究)

[0265] 发明人先前已经明确,人下消化道上皮类器官的培养所必需的微环境因子为Wnt激动剂(W)、R-spondin(R)、EGF(E)、Noggin等BMP抑制剂(N)、A83-01等TGF- β 抑制剂(A)、IGF1(I)、FGF2(F)。

[0266] 在本实验例中,研究了LATS抑制与类器官培养所必需的微环境因子的关联。图14示出了在添加WRENAIF的所有微环境因子的条件下以及去除这些微环境因子的一部分的条件下培养的人小肠来源类器官和人大肠来源类器官的增殖的测定结果。使用上述表1所示组成的培养基作为添加WRENAIF的所有微环境因子的培养基,使用从上述表1所示组成的培养基中去除对应的微环境因子的培养基作为去除这些微环境因子的一部分的培养基。通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP来测定细胞增殖。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。

[0267] 图14中,“Ctrl”表示在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的结果,“Lats-IN”表示在无Matrigel(注册商标)且有Lats-IN(终浓度10 μ M)的条件下培养的结果。另外,在横轴中,用黑色表示所添加的微环境因子,用浅色表示未添加的微环境因子。

[0268] 结果表明,即使不向培养液中添加人下消化道上皮类器官培养所必需的1或2种微环境因子,通过添加Lats-IN,细胞也会增殖。

[0269] 图15示出了在无Matrigel (注册商标) 且无或有Lats- IN (终浓度10 μ M) 条件下、在添加WRENAIF的所有微环境因子的条件下以及去除这些微环境因子的一部分的条件下培养的人小肠来源类器官的增殖的测定结果。在图15中,P0 ~ P16表示传代数0 ~ 传代数16。此外,图中的深色表示能传代,浅色表示无法传代。

[0270] 结果表明,即使添加Lats- IN,如果使用缺少了WRENAIF中任一个微环境因子的培养液进行培养,仍不能持久传代。由以上结果可知,Lat- IN并不能补充类器官培养所必需的微环境因子,而是与微环境因子协同促进类器官的增殖。

[0271] [实验例12]

[0272] (在无Matrigel (注册商标) 的条件下能进行类器官培养的机制的研究)

[0273] 研究了通过抑制LATS,为什么能在无Matrigel (注册商标) 的条件下培养类器官。

[0274] 在无或有Matrigel (注册商标) 、且无或有Lats- IN (终浓度10 μ M) 的条件下培养人小肠来源类器官和人大肠来源类器官,通过定量实时PCR对由Wnt表达调控的AXIN2基因的表达量进行研究。

[0275] 图16示出了定量实时PCR的结果。该结果表明,相比于在有Matrigel (注册商标) 的条件下培养类器官时观察到的AXIN2表达,在无Matrigel (注册商标) 的条件下培养类器官时AXIN2的表达量显著降低。此外,还表明如果在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下培养类器官,AXIN2的表达量上升至与在有Matrigel (注册商标) 条件下同等水平。

[0276] 接着,在无或有Matrigel (注册商标) 、且无或有Lats- IN (终浓度10 μ M) 的条件下培养人小肠来源类器官,通过蛋白质印迹检测由EGF信号诱导的磷酸化ERK。

[0277] 图17示出了蛋白质印迹的结果。图17中,“pERK”表示磷酸化ERK,“total ERK”表示总ERK (磷酸化ERK和非磷酸化ERK的合计)。另外,“pYAP”表示磷酸化YAP,“total YAP”表示总YAP (磷酸化YAP和非磷酸化YAP的合计)。作为针对磷酸化ERK的抗体,使用phospho-ERK (Thr202/Tyr204) (#4370,Cell Signaling Technology)。作为针对总ERK的抗体,使用total-ERK (#4695,Cell Signaling Technology)。作为针对磷酸化YAP的抗体,使用phospho-YAP (Ser127) (#4911,Cell Signaling Technology)。作为针对总YAP的抗体,使用total-YAP (#14074,Cell Signaling Technology)。

[0278] 结果表明,相比于在有Matrigel (注册商标) 的条件下培养类器官时观察到的ERK磷酸化,在无Matrigel (注册商标) 的条件下培养类器官时,ERK磷酸化显著降低。此外,还表明如果在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下培养类器官,ERK磷酸化上升至与在有Matrigel (注册商标) 的条件下同等水平。

[0279] 以上结果表明,在无Matrigel (注册商标) 的条件下无法进入细胞内的Wnt信号、EGF信号,通过抑制LATS,即使在无Matrigel (注册商标) 的条件下也能进入细胞内,该结果表明,由于细胞增殖变得可能,类器官培养也变得可能。

[0280] [实验例13]

[0281] (类器官形态的研究3)

[0282] 与实验例7相同,在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN (终浓度10 μ M) 的条件下建立人大肠来源类器官,观察形态和性质。本实验例与实验例9相比,不同点在于,从类器官的建立时起就不使用Matrigel (注册商标)。

[0283] 图18是对建立后、进行18次传代、培养七天的人大肠来源类器官免疫染色的代表

性照片。图18中,比例尺表示50 μm 。

[0284] 免疫染色中,检测顶端侧标记物Ezrin、基底膜标记物整联蛋白 $\beta 4$ ($\beta 4$ -Integrin)、细胞间粘附标记物 β -连环蛋白 (β -Catenin)、胚胎细胞标记物Mucin2 (MUC2)、肠道内分泌细胞标记物ChromograninA (CHGA)、核 (Nuc)。

[0285] 如上所述,在有Matrigel (注册商标) 的条件下培养的常规人下消化道类器官呈球形,保持顶端极性的单层上皮细胞薄片的内侧为顶端侧,一个类器官内包含干细胞、胚胎细胞、肠道内分泌细胞等分化细胞。

[0286] 相反,如图18所示,在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下建立的人大肠来源类器官是细胞多层化的球形形态,未保持上皮细胞顶端极性,与在有Matrigel (注册商标) 的条件下培养的常规人下消化道类器官的形态大不相同。

[0287] 然而,如图18所示,在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下建立的人下消化道类器官,由于已证实胚胎细胞标记物Mucin2、肠道内分泌细胞标记物ChromograninA表达,因此认为与在有Matrigel (注册商标) 的条件下建立的常规人下消化道类器官一样,一个类器官内包含干细胞和分化细胞。

[0288] 图19是在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下建立后、进行18次传代、培养7天的人大肠来源类器官的显微镜照片。图19左侧的照片的比例尺为500 μm ,图19右侧的照片的比例尺为100 μm 。

[0289] [实验例14]

[0290] (类器官形态的研究4)

[0291] 与实验例7相同,在有Matrigel (注册商标) 的条件下初次培养在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN (终浓度10 μM) 的条件下建立的人大肠来源类器官,观察形态和性质。本实验例与实验例9相比不同点在于,在无Matrigel (注册商标) 条件下进行类器官的建立。

[0292] 图20是对在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下建立、进行18次传代后、在有Matrigel (注册商标) 的条件下初次培养7天的人大肠来源类器官免疫染色的代表性照片。图20中,比例尺表示50 μm 。

[0293] 在免疫染色中,检测顶端侧标记物Ezrin、基底膜标记物整联蛋白 $\beta 4$ ($\beta 4$ -Integrin)、细胞间粘附标记物 β -连环蛋白 (β -Catenin)、胚胎细胞标记物Mucin2 (MUC2)、肠道内分泌细胞标记物ChromograninA (CHGA)、核 (Nuc)。

[0294] 结果表明,如图20所示,即使是在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下建立的人下消化道类器官,在有Matrigel (注册商标) 的条件下培养时,也呈球形,保持顶端极性的单层上皮细胞薄片的内侧为顶端侧,一个类器官内包含胚胎细胞、肠道内分泌细胞等分化细胞。

[0295] 该结果表明,即使是在无Matrigel (注册商标) 的条件下建立,人下消化道上皮细胞的性质仍保持不变。

[0296] 图21是在无Matrigel (注册商标) 且有Lats- IN的条件下建立、进行18次传代后、在有Matrigel (注册商标) 的条件下初次培养7天的人大肠来源类器官的显微镜照片。图21左侧的照片的比例尺为500 μm ,图21右侧的照片的比例尺为100 μm 。

[0297] [实验例15]

[0298] (在无Matrigel (注册商标) 的条件下的肝细胞类器官的培养)

[0299] 向由原代人肝细胞建立的人肝细胞类器官中添加TrypLE Express (赛默飞世尔科技), 在37°C下孵育5分钟, 解离成单细胞。

[0300] 接着, 回收细胞, 悬浮于添加2 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、50 μ M TDI-011536 (CAS号: 2687970-96-1) 的增殖培养基中, 以2000个/孔接种 (优选以2000~4000个/孔接种) 于Ultra Low attachment 96孔板中。另外, 使用未添加有TDI-011536的增殖培养基中的细胞作为对照。

[0301] 增殖培养基是在基础培养基 (高级DMEM/F-12培养基、10mM HEPES、2mM GlutaMAX、100U青霉素、100 μ g/mL链霉素) 中添加有10% Afamin-Wnt-3A条件培养基 (conditioned medium)、2% R-spondin1条件培养基、2% Noggin条件培养基、20ng/mL抑瘤素M的培养基。

[0302] 接种后第六天, 使用市售试剂盒 (产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega), 测定人肝细胞类器官的存活细胞数。

[0303] 图22示出了存活细胞数的测定结果。结果, 添加20 μ M TDI-011536 (LATS-IN)、50 μ M TDI-011536组中, 测出与对照组相比16、17倍的存活细胞数。在其他LATS-IN (例如TRULI) 中也观察到存活细胞数增加, 存活细胞数增加约3倍, 表明在无Matrigel且有LATS-IN的条件下人肝细胞类器官的存活细胞数增加。

[0304] [实验例16]

[0305] (在无Matrigel (注册商标) 的条件下的肝细胞类器官的建立)

[0306] 将冷冻的原代人肝细胞悬浮并解冻于高级DMEM/F-12培养基中。使用Line 1和Line 2这2种作为原代人肝细胞。

[0307] 接着, 用APC标记小鼠抗人EpCAM抗体对解冻的各原代人肝细胞进行染色, 使用细胞分选仪回收EpCAM阴性细胞。接着, 将回收的细胞悬浮于添加有20 μ M TDI-011536的增殖培养基中, 以3000~4000个/孔接种于Ultra Low attachment 96孔板中。然后, 培养细胞, 得到肝细胞类器官。另外, 为了进行比较, 还准备了未添加TDI-011536的增殖培养基、未添加抑瘤素M的增殖培养基培养的细胞。

[0308] 按如下进行在无Matrigel (注册商标) 的条件下的肝细胞类器官的传代。首先, 使用1mM EDTA/磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 螯合钙离子、镁离子。接着, 添加TrypLE Express (赛默飞世尔科技), 在37°C下培育5分钟, 解离成单细胞。

[0309] 接着, 将回收的细胞悬浮于添加有20 μ M TDI-011536的增殖培养基中, 以2000个/孔接种于Ultra Low attachment 96孔板中。

[0310] 图23是培养开始1天后和9天后拍摄的各细胞的显微镜照片。比例尺为500 μ m。另外, 图24示出了测定的细胞增殖随时间变化的结果。图24中, 图的纵轴表示细胞增殖 (倍数), 横轴表示培养天数。在图23和图24中, “OSM” 表示抑瘤素M, “Lats IN” 表示Lats激酶抑制剂 (TDI-011536)。

[0311] 结果, 如图22所示, 观察到在添加Lats激酶抑制剂 (TDI-011536) 下存活细胞数增加, 进一步如图23所示, 在使用添加有Lats激酶抑制剂 (TDI-011536) 和抑瘤素M两者的增殖培养基的情况下, 成功建立了良好的人肝细胞类器官。建立的人肝细胞类器官可以培养至少2个月, 细胞数从建立增殖至 $10^6 \sim 10^8$ 倍 (图24)。

[0312] [实验例17]

[0313] (在无Matrigel (注册商标) 的条件下培养的肝细胞类器官的研究)

[0314] 对在无Matrigel(注册商标)的条件下培养的肝细胞类器官荧光免疫染色,证实为肝细胞。为了进行比较,也对在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的肝细胞类器官荧光免疫染色。

[0315] 首先,使用1%甲醛/HEPES缓冲生理盐水(HBS)固定人肝细胞类器官。接着,使用1%Triton-X100/PBS使固定的人肝细胞类器官穿孔。然后,使用1%BSA/PBS封闭人肝细胞类器官。接着,使用小鼠抗HNF4 α 抗体(赛默飞世尔科技)对肝细胞标记物HNF4 α 免疫染色。

[0316] 图25示出了荧光免疫染色结果的显微镜照片。比例尺为50 μ m。图25中,“Matrigel(+)”示出了在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的肝细胞类器官的结果,“Matrigel(-)”示出了在无Matrigel(注册商标)的条件下培养的肝细胞类器官的结果。另外,“Nuc”表示染色核的结果。

[0317] 结果表明,在无Matrigel(注册商标)的条件下培养的人肝细胞类器官,与在有Matrigel(注册商标)的条件下培养的肝细胞类器官一样,也表达肝细胞标记物HNF4 α 。结果表明,在无Matrigel(注册商标)的条件下培养的人肝细胞类器官也毫无疑问为肝细胞类器官。

[0318] [实验例18]

[0319] (在有LATS激酶抑制剂的条件下的类器官培养3)

[0320] 与实验例2一样,在无Matrigel(注册商标)且有LATS激酶抑制剂(终浓度20 μ M)或无LATS激酶抑制剂(对照)的条件下培养人大肠来源类器官和人小肠来源类器官,观察其动态。

[0321] 使用GA-017(CAS号:2351906-74-4)、TDI-011536(CAS号:2687970-96-1)和TRULI(CAS号:1424635-83-5,也称为“Lats-IN”、“Lats-IN-1”)作为LATS激酶抑制剂。

[0322] 图26示出了培养6天后的各类器官的细胞数的结果,该结果通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP来测定。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。图26左侧是人大肠来源类器官的结果,图26右侧是人小肠来源类器官的结果。

[0323] 结果表明,在使用任一LATS激酶抑制剂的情况下,即使在无Matrigel(注册商标)的条件下,人大肠来源类器官和人小肠来源类器官的细胞增殖都被显著激活。

[0324] [实验例19]

[0325] (从单细胞形成类器官的研究2)

[0326] 使人大肠来源类器官解离成单细胞后,观察从单细胞的类器官形成。

[0327] 图27示出了在有(+)或无(-)Matrigel(注册商标)且无(-)或有(+,终浓度10 μ M)TRULI的条件下从单细胞形成类器官的结果。图27的括号内,分母表示接种的单细胞的数量,分子表示形成的类器官的数量。另外,图的纵轴表示接种的单细胞中形成类器官的细胞的比例(%)。

[0328] 结果表明,在无Matrigel(注册商标)且无TRULI的条件下,细胞几乎不增殖。相反,表明在有Matrigel(注册商标)的条件下、以及在无Matrigel(注册商标)且有TRULI的条件下,细胞从单细胞增殖,形成类器官。

[0329] [实验例20]

[0330] (集落尺寸的研究)

[0331] 使人小肠来源类器官解离成单细胞后,观察从单细胞形成类器官。图28示出了在有(+)或无(-)Matrigel(注册商标)、且无(-)或有(+、终浓度10 μ M)TRULI的条件下从单细胞形成类器官,测定的集落尺寸的结果。使用软件(Image J)测定集落尺寸。图28中,纵轴表示集落尺寸(mm²)。

[0332] [实验例21]

[0333] (在有LATS激酶抑制剂的条件下的类器官培养4)

[0334] 使人的各种组织源类器官解离成单细胞后,与实验例2一样,在无Matrigel(注册商标)且有LATS激酶抑制剂的条件下、或无Matrigel(注册商标)且无LATS激酶抑制剂的条件下(对照)进行培养,观察其动态。

[0335] 使用TDI-011536(CAS号:2687970-96-1)和TRULI(CAS号:1424635-83-5,也称为“Lats-IN”、“Lats-IN-1”)作为LATS激酶抑制剂。根据类器官不同,使用浓度为5 μ M~20 μ M的LATS激酶抑制剂。

[0336] 图29是培养6天后的各类器官的明视场显微镜照片并示出了通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP而测定的各类器官的细胞数结果的图。图的纵轴表示发光强度(相对值),表征ATP的存在量。在图29中,上部分左侧为人肝来源类器官的结果,上部分中央为人唾液腺来源类器官的结果,上部分右侧为人肺泡来源类器官的结果,下部分左侧为人呼吸道来源类器官的结果,下部分左数第二个为人胰脏来源类器官的结果,下部分左数第三个为人胃来源类器官的结果,下部分右侧为人胆道来源类器官的结果。另外,“Control”表示对照的结果,“TDI”表示添加了TDI-011536的组的结果。

[0337] 结果表明,无论使用哪种LATS激酶抑制剂,在无Matrigel(注册商标)的条件下,各种组织源类器官的细胞增殖都被显著激活。

[0338] [实验例22]

[0339] (在无Matrigel(注册商标)的条件下类器官建立)

[0340] 从人结肠提取隐窝使其解离成单细胞后,在有Matrigel(注册商标)的条件下、或在无Matrigel(注册商标)且有TRULI的条件下进行培养,建立类器官。另外,通过使用市售试剂盒(产品名“CellTiter-Glo 3D”、Promega)测定ATP来测定条件下的各类器官的细胞数。

[0341] 图30上部分是说明本实验例的概要的示意图。图30下部分示出了类器官的增殖的测定结果。结果,在有TRULI的条件下,即使无Matrigel(注册商标),也观察到与在有Matrigel(注册商标)的条件下相同水平的细胞增殖。

[0342] [实验例23]

[0343] (在无Matrigel(注册商标)的条件下建立的类器官的原位异种移植)

[0344] 研究了实验例22中的在无Matrigel(注册商标)且有TRULI的条件下建立的人结肠源类器官被原位异种移植到免疫缺陷小鼠(NOG小鼠)中是否正常发挥机能。

[0345] 图31是说明本实验例的概要的示意图。将绿色荧光蛋白(GFP)的表达载体电穿孔至在无Matrigel(注册商标)且有TRULI的条件下建立的人结肠源类器官,得到GFP标记人结肠源类器官。

[0346] 接着,在使GFP标记人结肠源类器官解离成单细胞后,在添加有2%Matrigel(注册商标)或2%胶原蛋白凝胶(50% IA型、50% IC型)的培养基中预培养4天。在2%胶原蛋白凝

胶的培养中,向培养基中添加 $2.5\mu\text{M}$ 的16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2,Cayman Chemical)、50ng/mL人重组肝细胞生长因子(HGF,PeproTech)、20ng/mL人重组抑瘤素M(OSM,PeproTech)、5nM人重组调蛋白 $\beta 1$ (NRG1,PeproTech)。

[0347] 接着,去除NOG小鼠的结肠上皮及粘膜,原位异种移植GFP标记人结肠源类器官。首先,通过吸入2~3%异氟烷麻醉给予正常食物的NOG小鼠。接着,用PBS清洗小鼠结肠,去除管腔内容物。然后,将装有小球囊的导管插入肛门,用空气扩张球囊维持导管。接着,将高温EDTA(250mM、 50°C ~ 55°C)注入直肠以去除结肠粘膜,螯合细胞-细胞间粘附及细胞-细胞外基质间粘附所必需的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。

[0348] 接着,使用振动电动牙刷(EW-DL22、EW0945、松下)摩擦大肠上皮和粘膜。将分离的结肠上皮从振动电动牙刷上释放到充满水的培养皿中,确认上皮和粘膜成功去除。

[0349] 接着,在计数预培养的GFP标记人结肠源类器官的总细胞数后,将细胞悬浮于添加有10%(vol/vol)Matrigel(注册商标)或IA型胶原蛋白的高级DMEM/F12培养基中,使用200 μL 移液管,将70 μL 含有 1×10^7 个细胞的类器官悬浮液注入到去除结肠上皮和粘膜的NOG小鼠(受体小鼠)的结肠中。然后,为了维持结肠内GFP标记人结肠源类器官的功能,使用粘接剂用柔软的纸暂时堵塞小鼠的肛门。仔细观察受体小鼠的粪便一周,以检查肠阻塞发生。

[0350] 图32上部分最左侧是观察的移植GFP标记人结肠源类器官的NOG小鼠的结肠的明视场照片。图32上部分左数第二个是拍摄的与图32上部分最左侧相同视野的GFP荧光的照片。图32上部分左数第三个是对损伤部分染色的小鼠的肠的照片。图32上部分右侧示出了用抗人细胞角蛋白抗体免疫染色的移植GFP标记人结肠源类器官的NOG小鼠的结肠切片的结果的显微镜照片。比例尺为200 μm 。

[0351] 图32下部分最左侧示出了通过与人LGR5基因的mRNA的原位杂交对图32上部分右侧虚线包围区域染色的结果的荧光显微镜照片。图32下部分左数第二个是对图32上部分右侧虚线包围区域放大的照片。比例尺为100 μm 。图32下部分左数第三个示出了用抗人嗜铬粒蛋白A(CHGA)抗体、抗人绒毛蛋白(Villin)抗体对图32上部分右侧虚线包围区域染色的结果的荧光显微镜照片。比例尺为100 μm 。图32下部分右侧示出了用抗人黏蛋白2(MUC2)抗体、抗人绒毛蛋白(Villin)抗体对图32上部分右侧虚线包围区域染色的结果的荧光显微镜照片。比例尺为100 μm 。

[0352] 以上结果表明,在无Matrigel(注册商标)且有TRULI的条件下建立的人结肠源类器官,可以通过原位异种移植至免疫缺陷小鼠(NOg小鼠)中正常发挥机能。由此表明,在无Matrigel且有TRUL1的条件下制作的类器官可以用于再生医疗。

[0353] [产业上的利用可能性]

[0354] 根据本发明,可以提供在不存在细胞外基质的条件下培养类器官的技术。

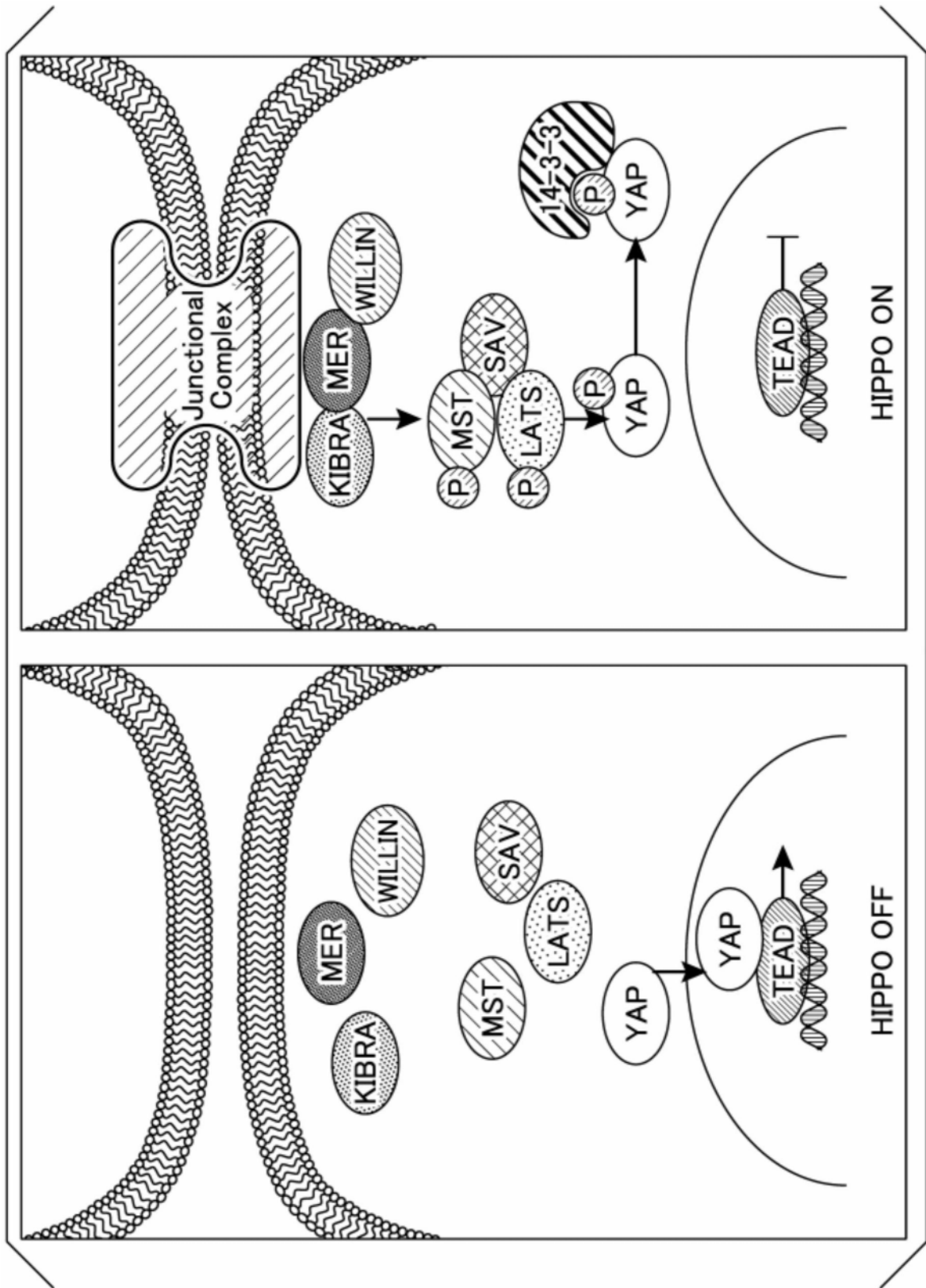


图1

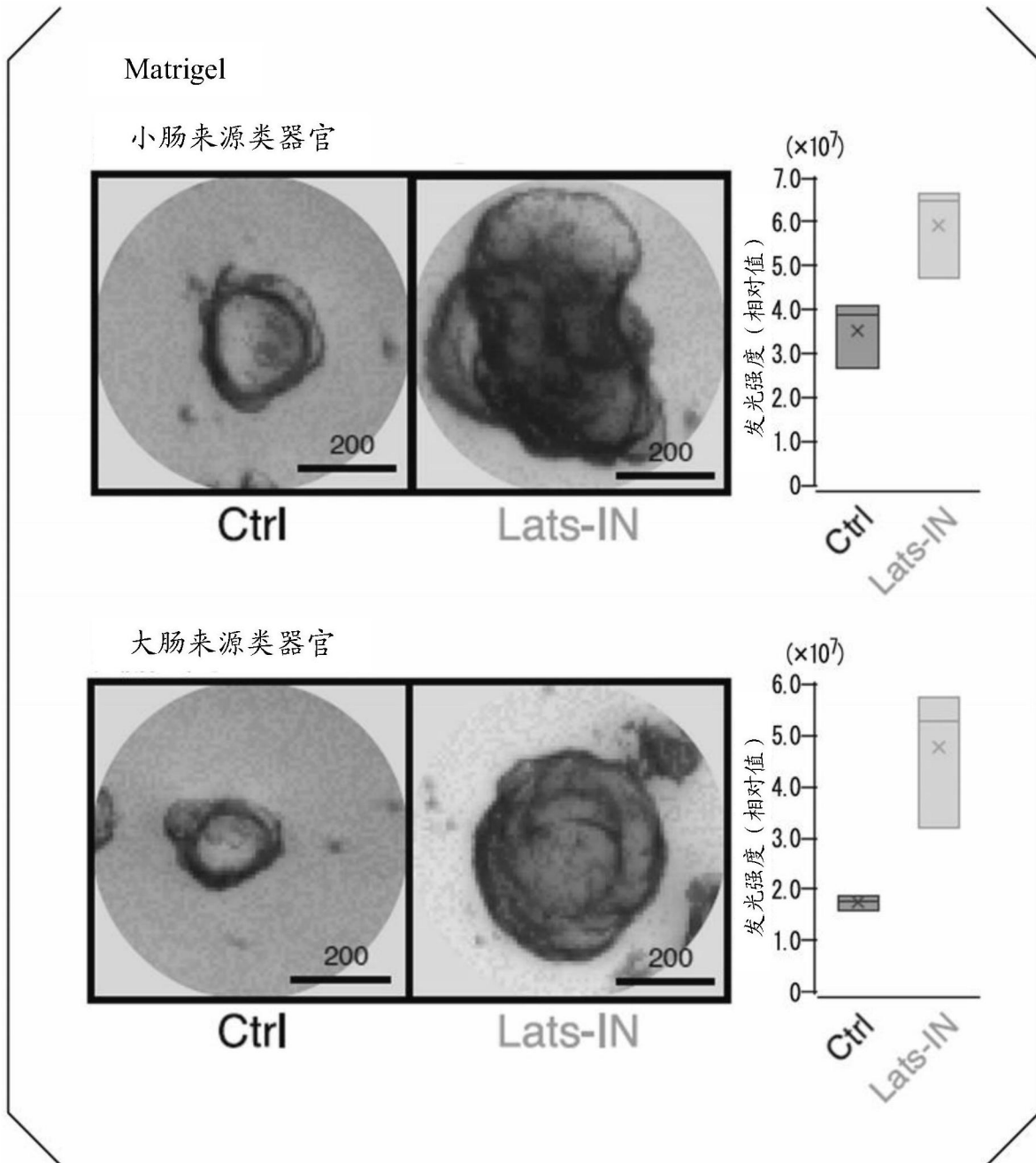


图2

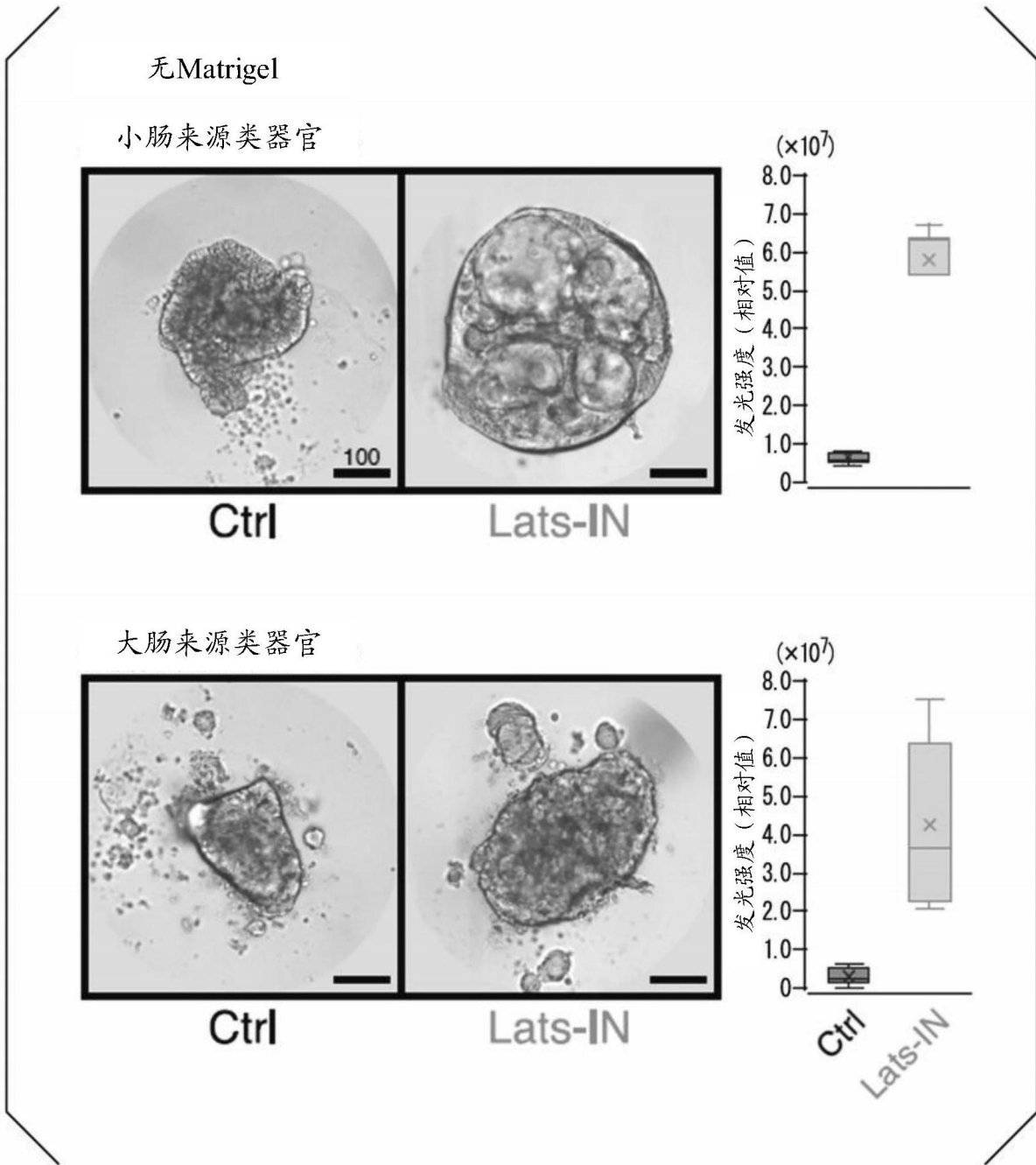


图3

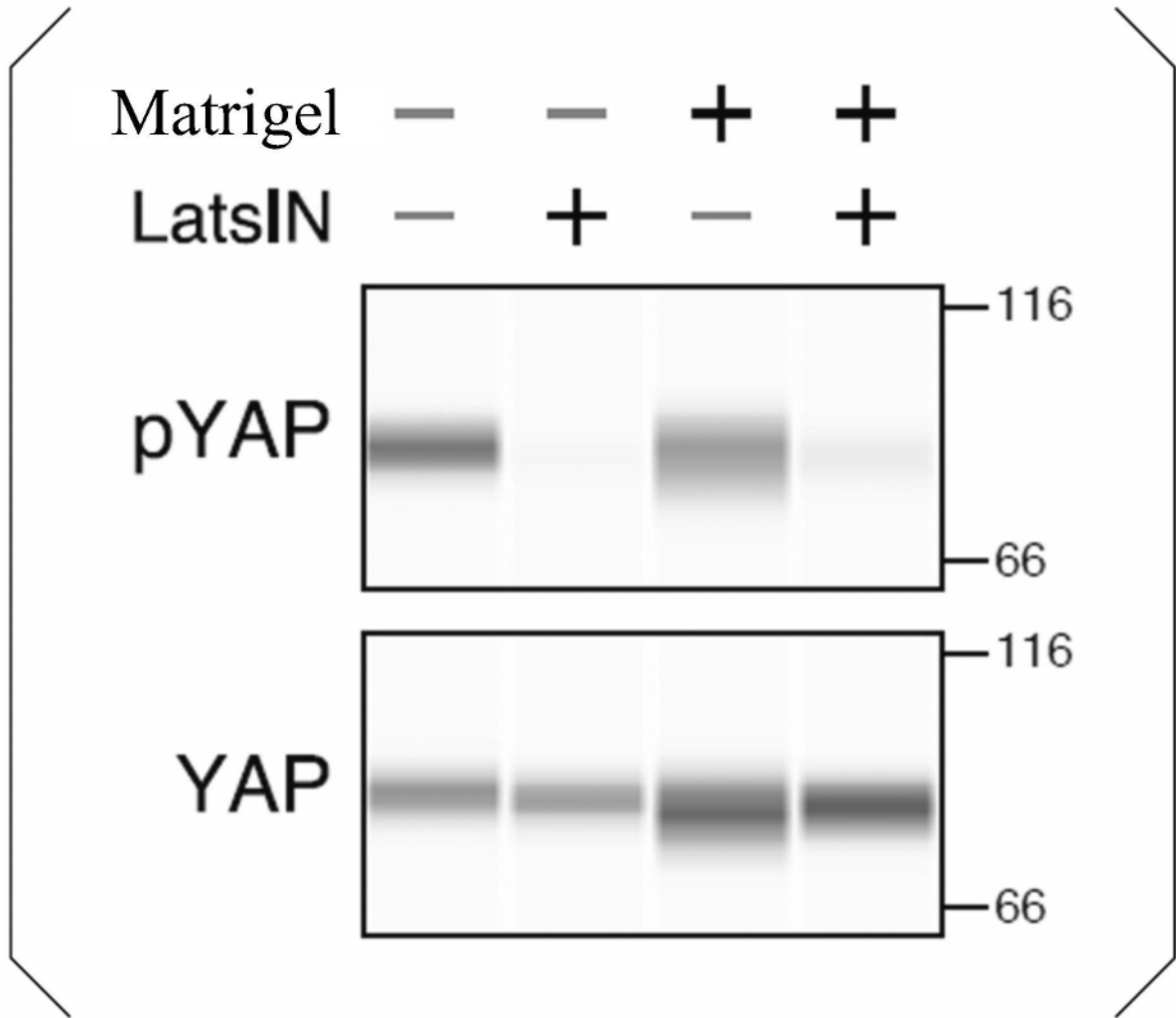


图4

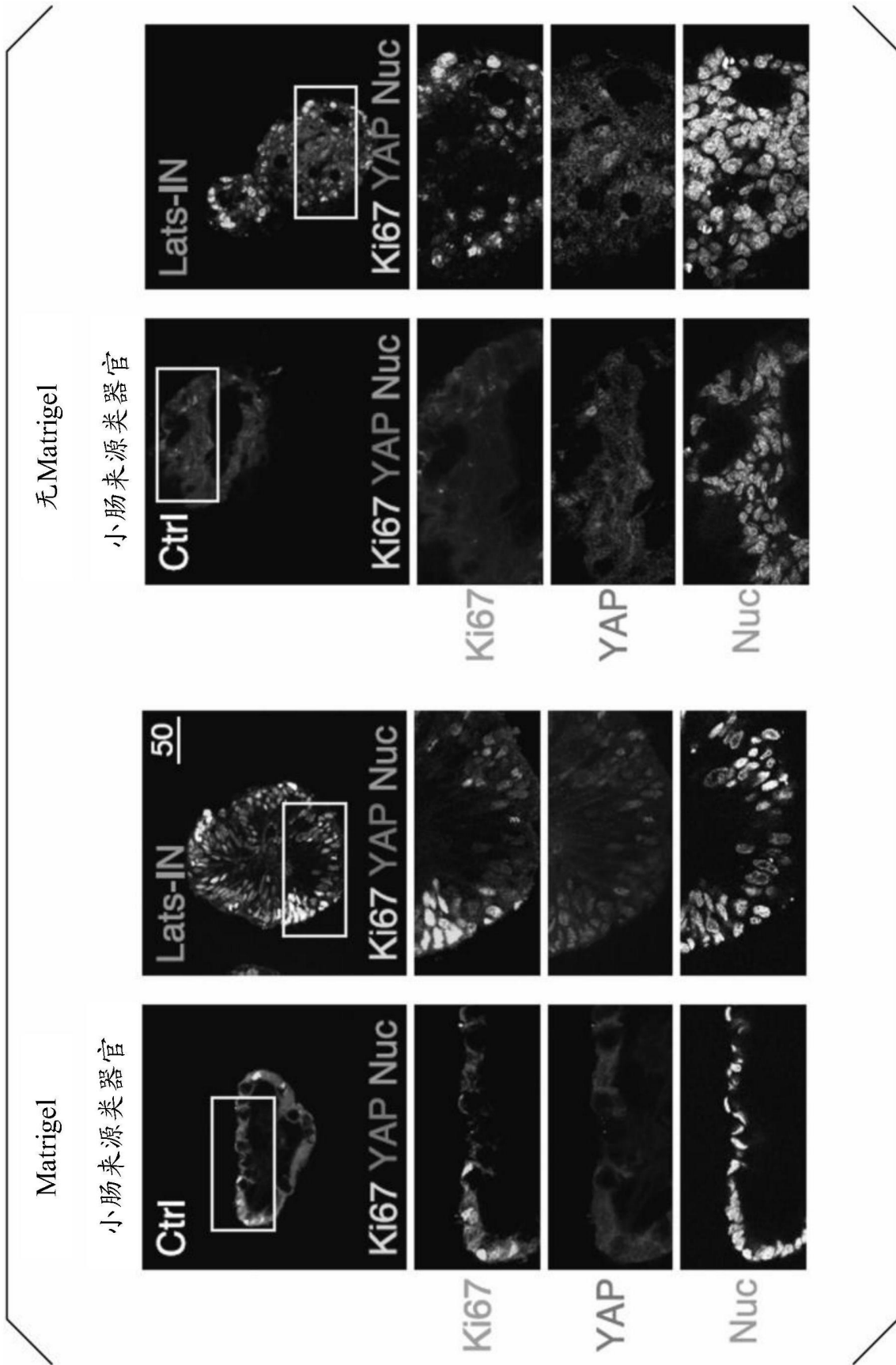


图5

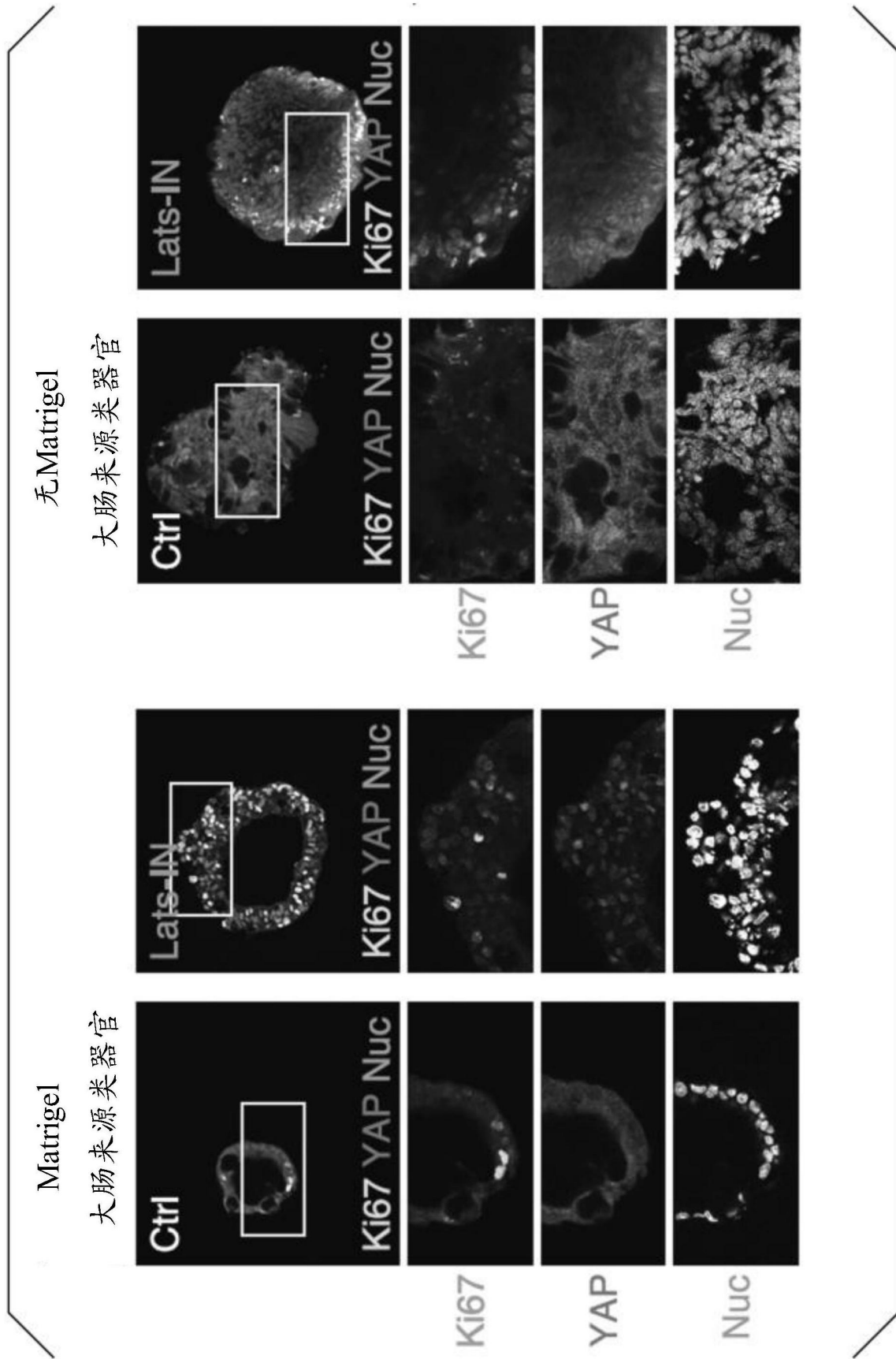


图6

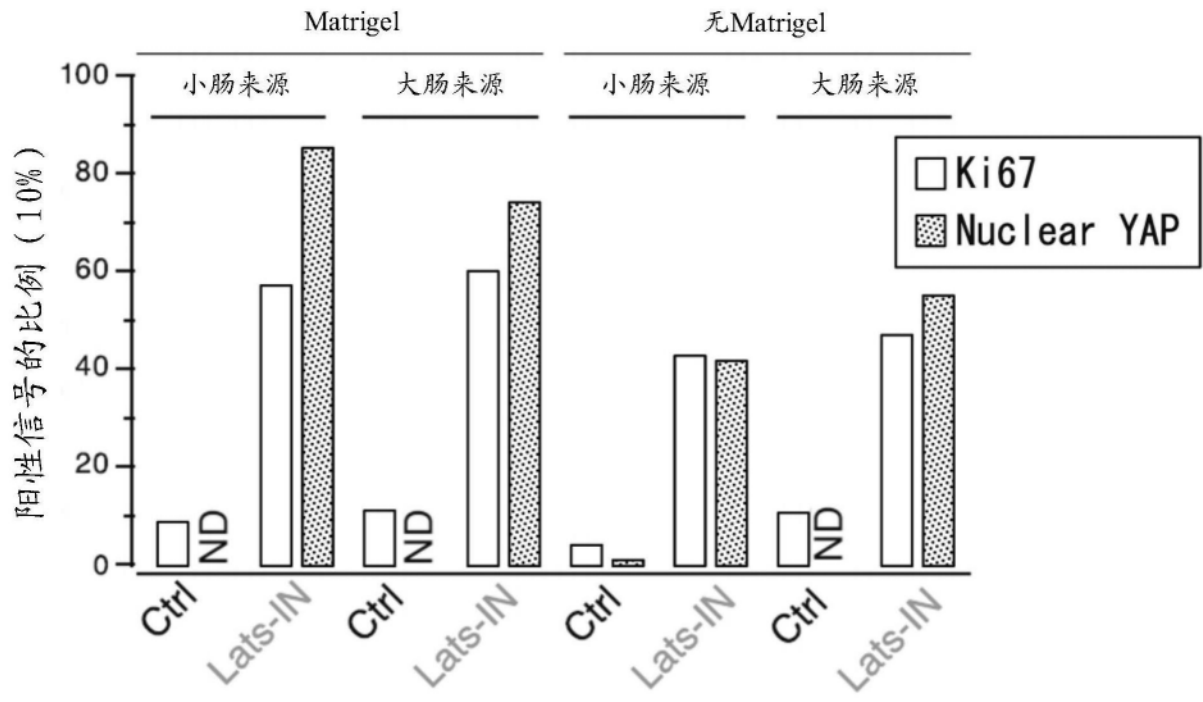


图7

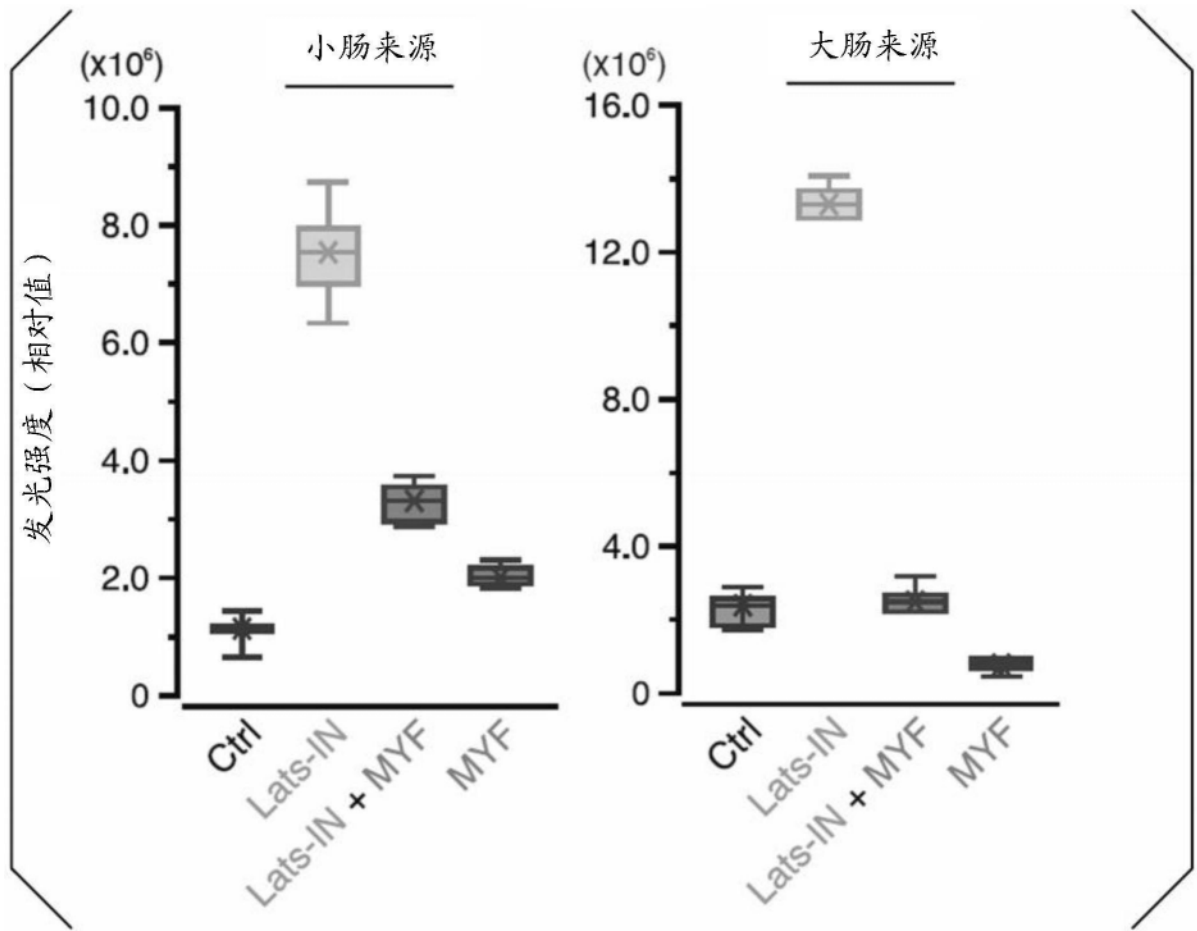


图8

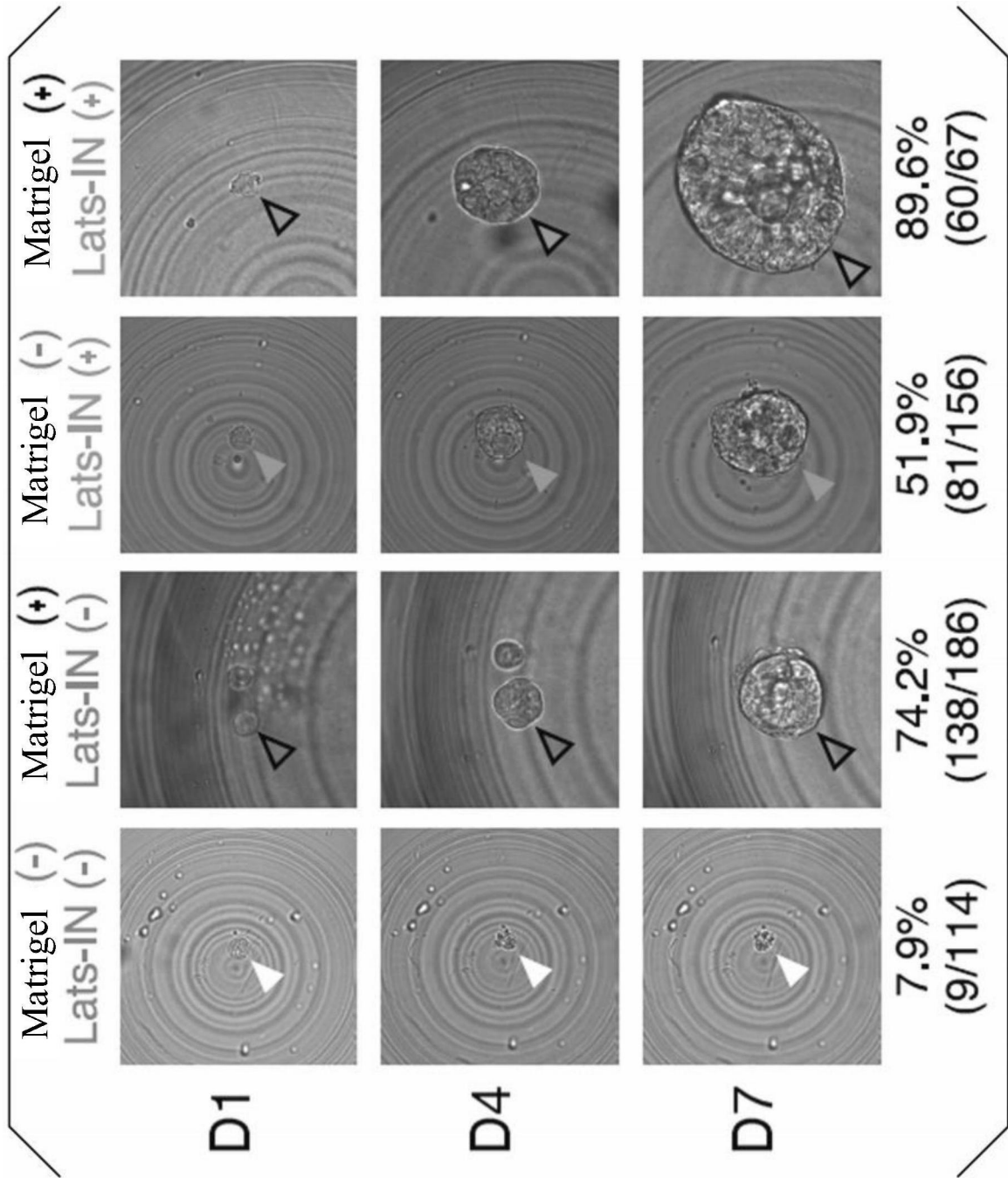


图9

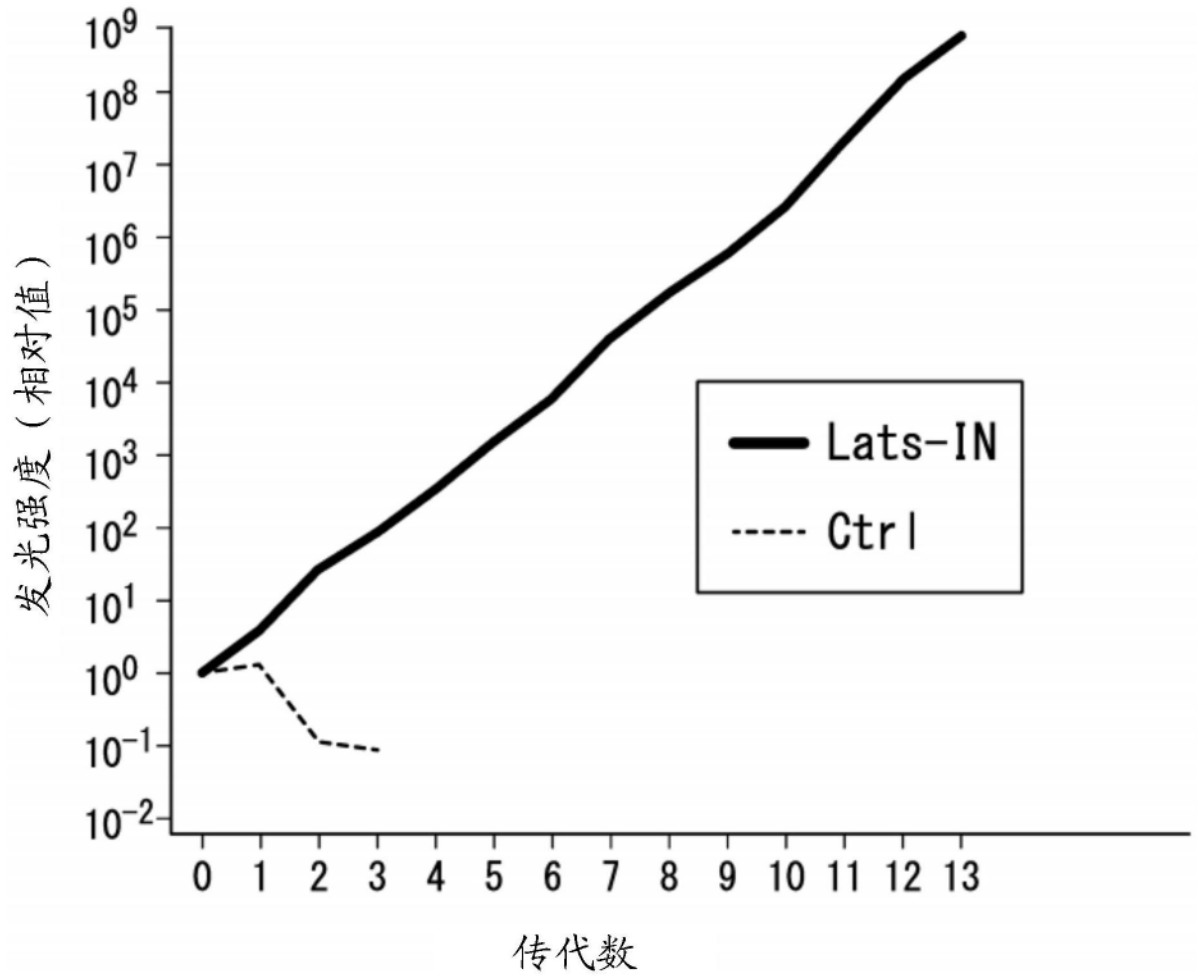


图10

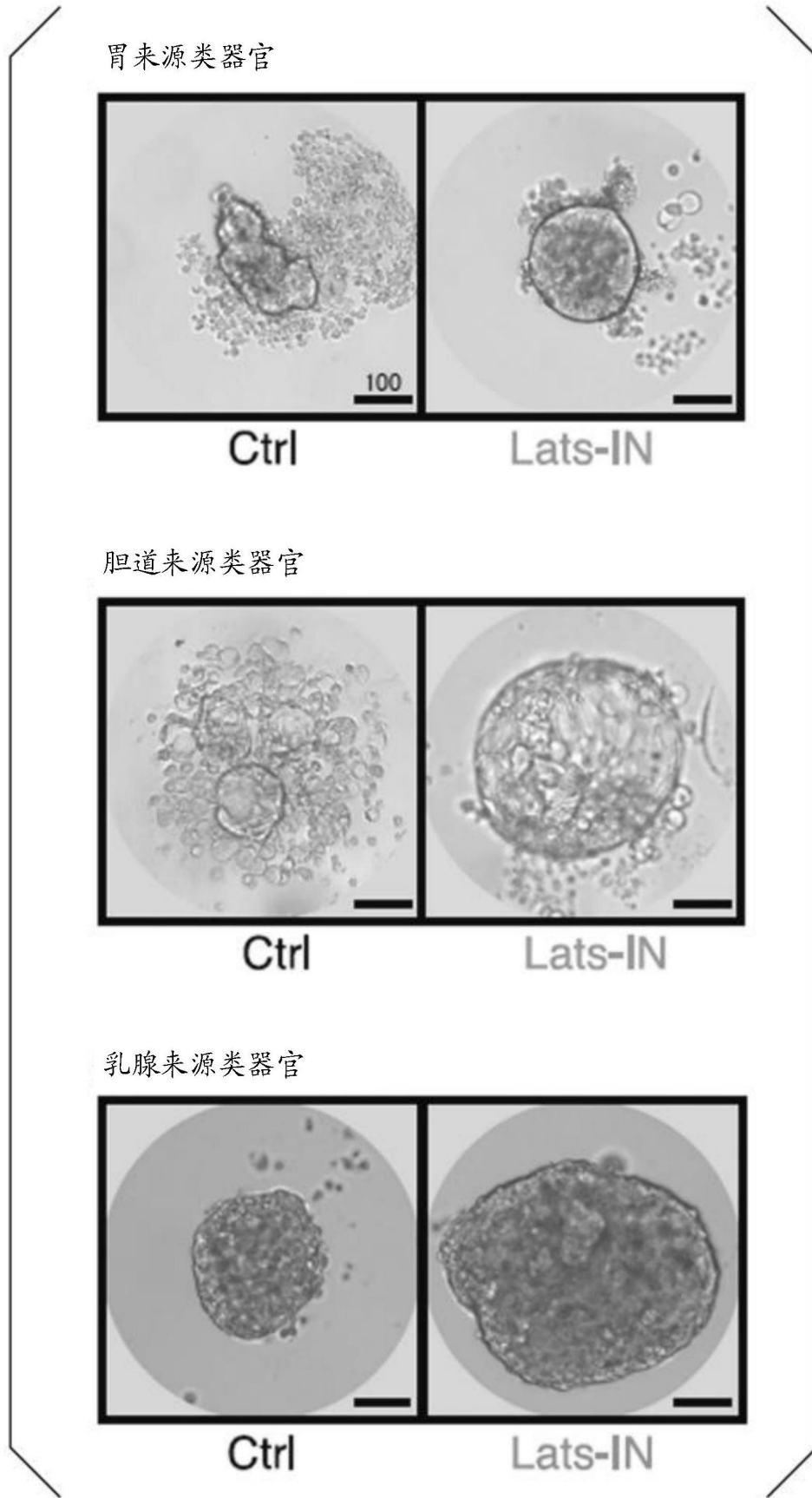


图11

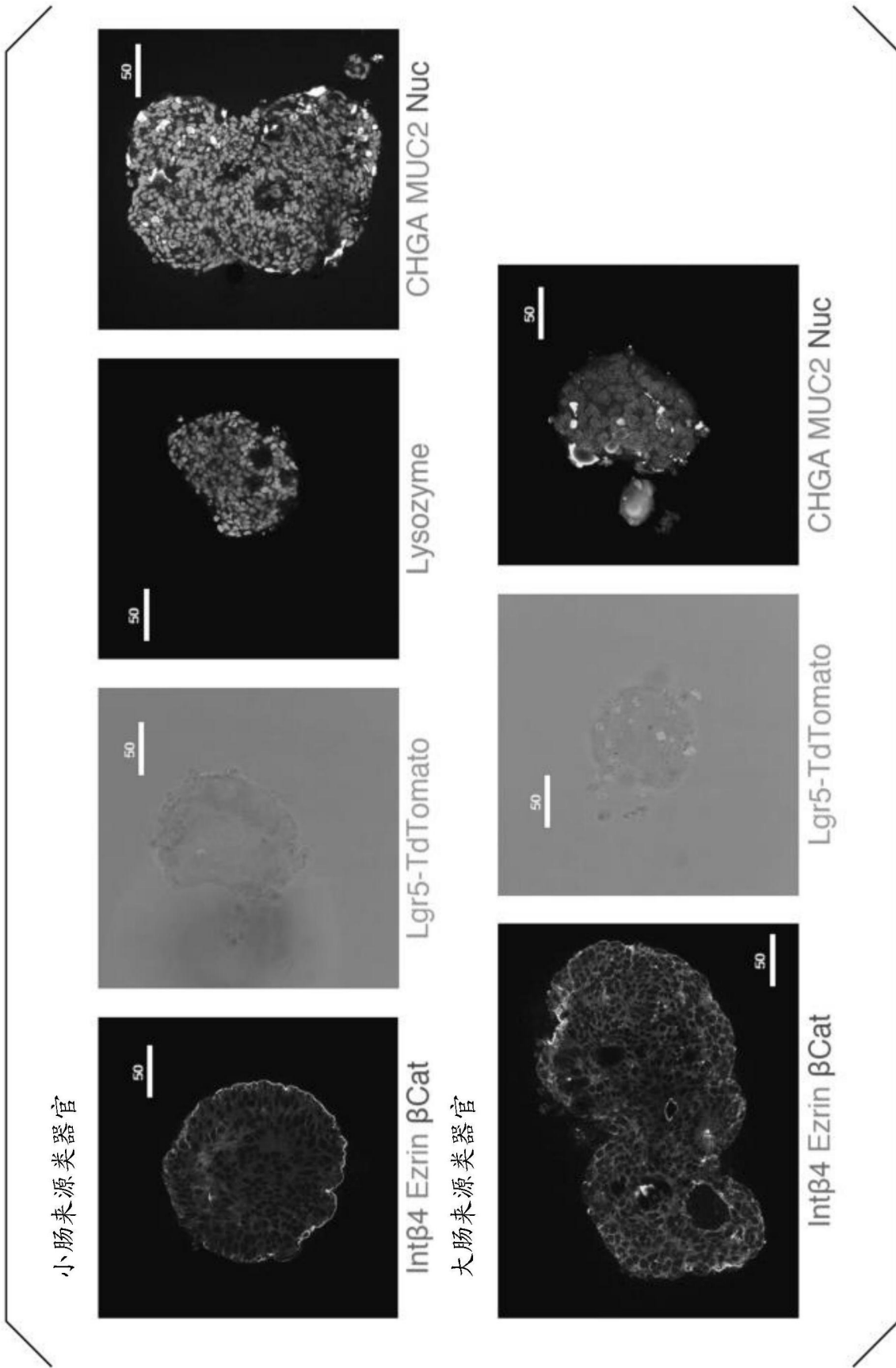


图12

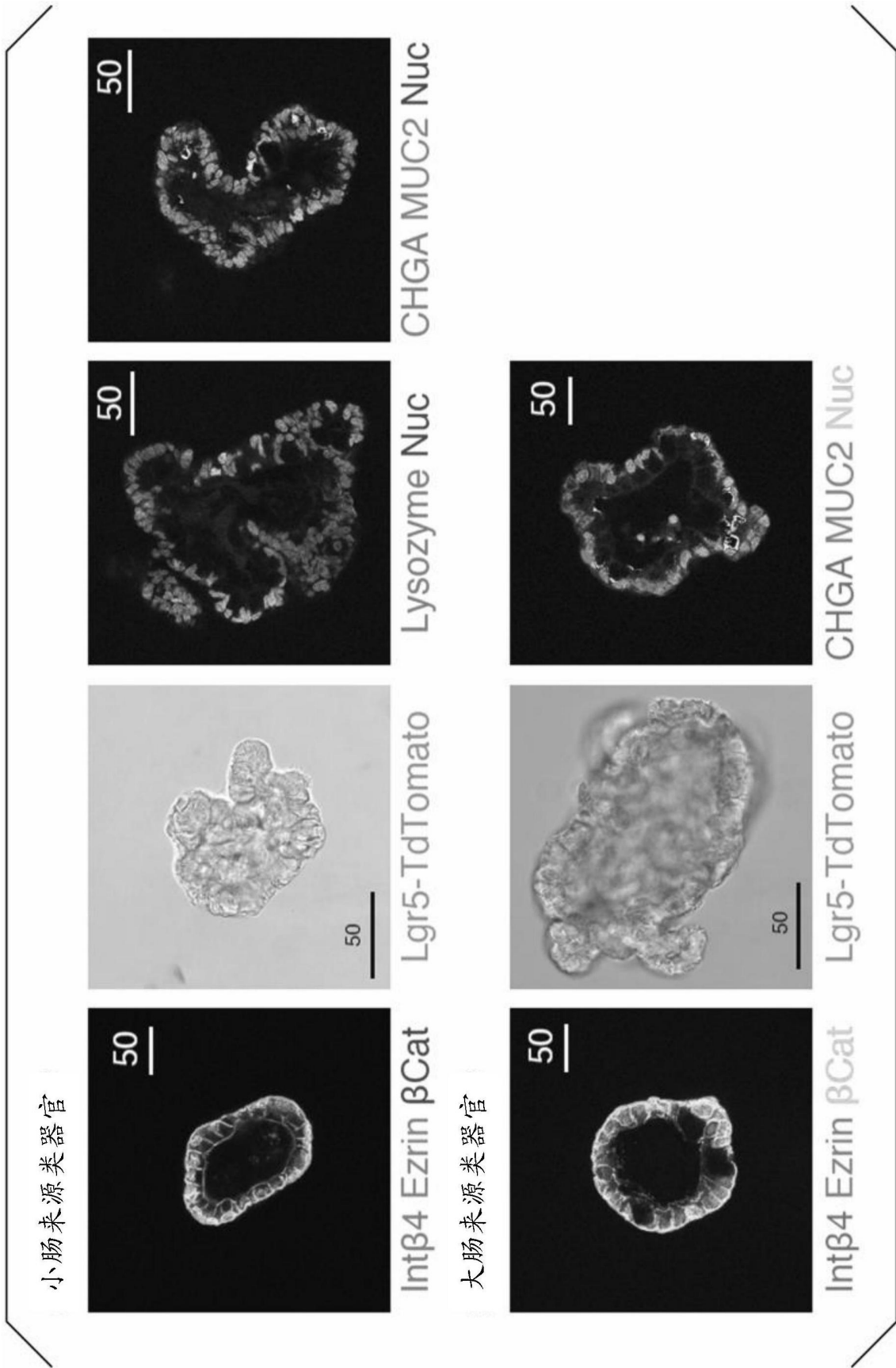


图13

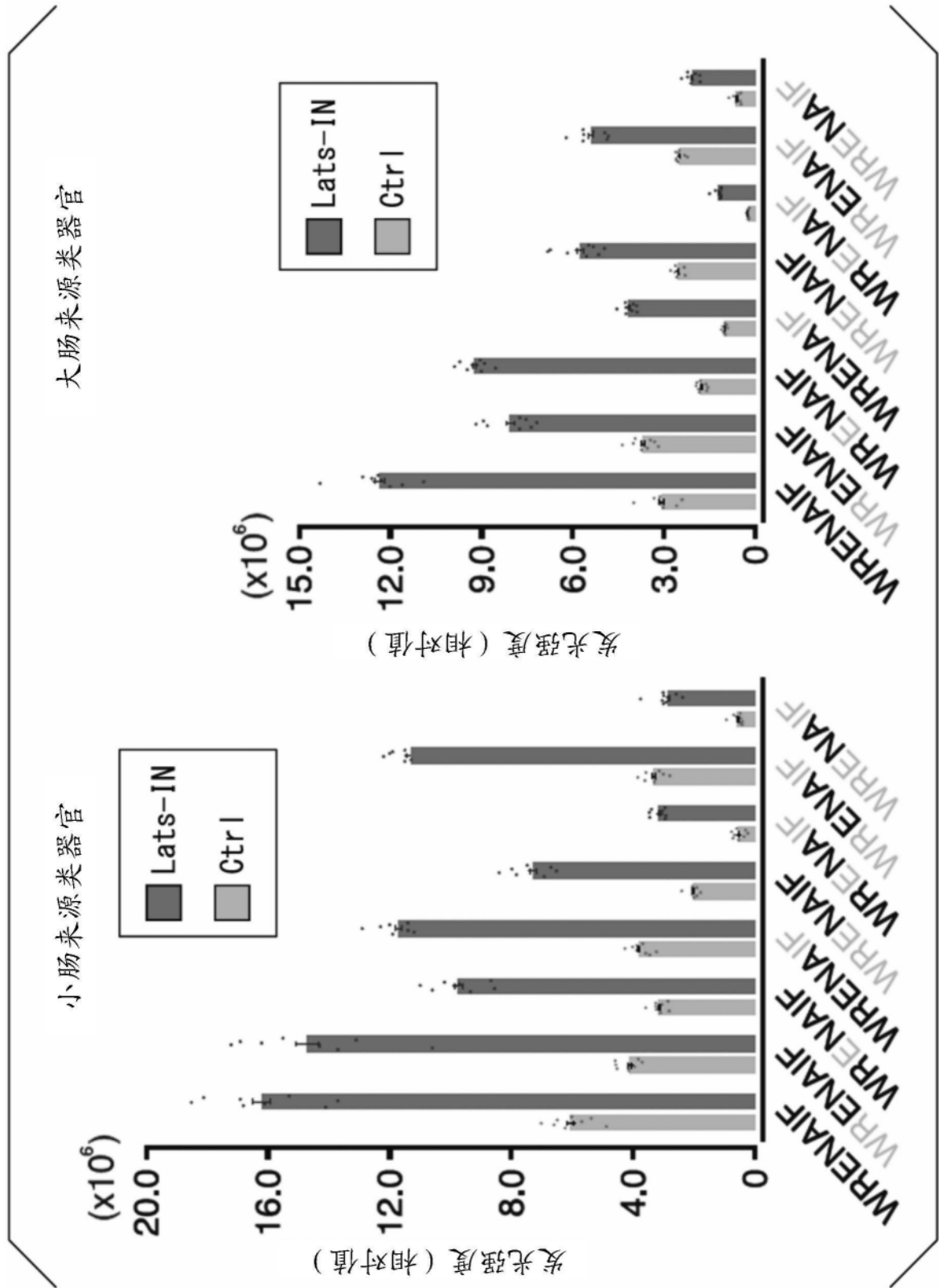


图14

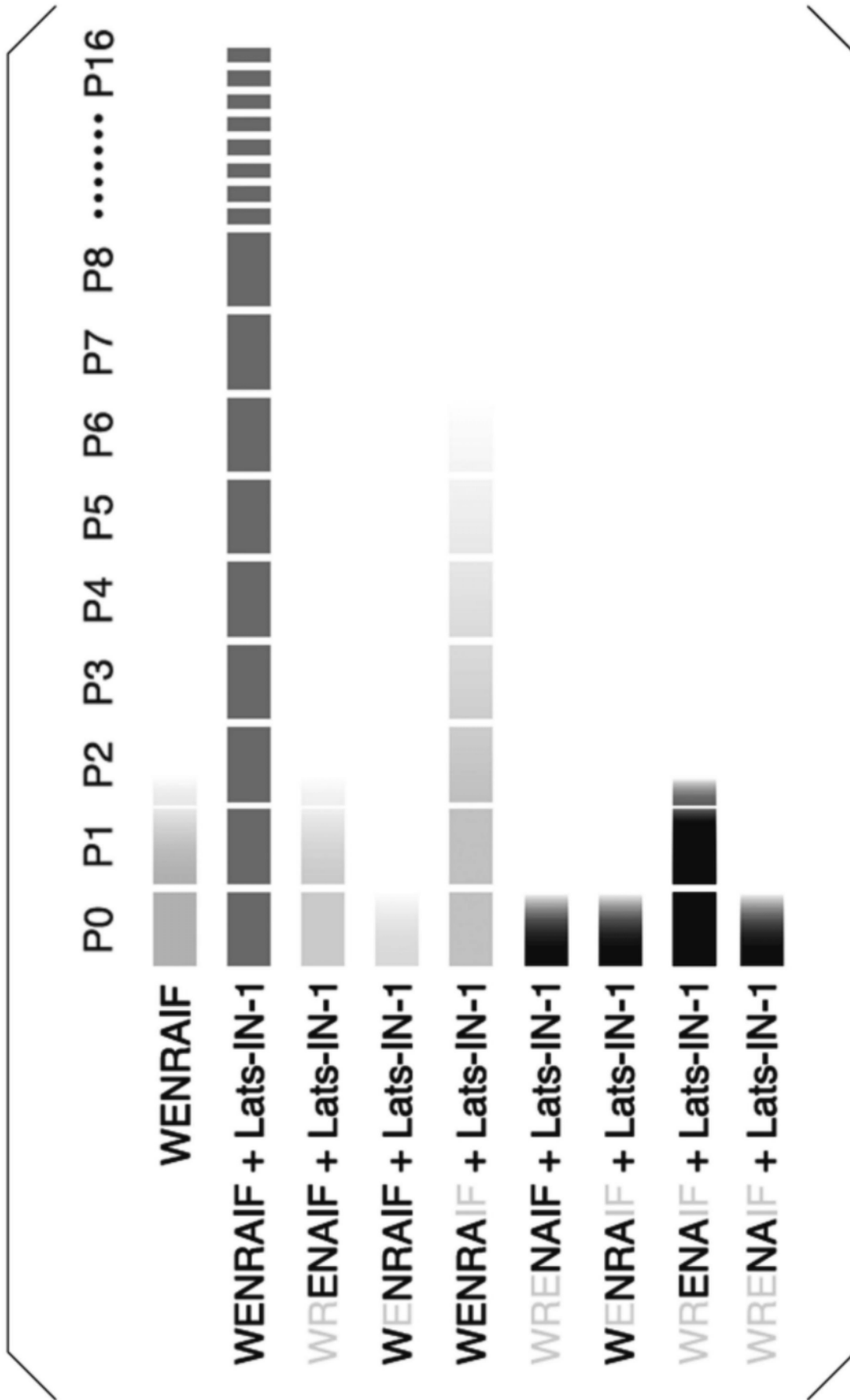


图15

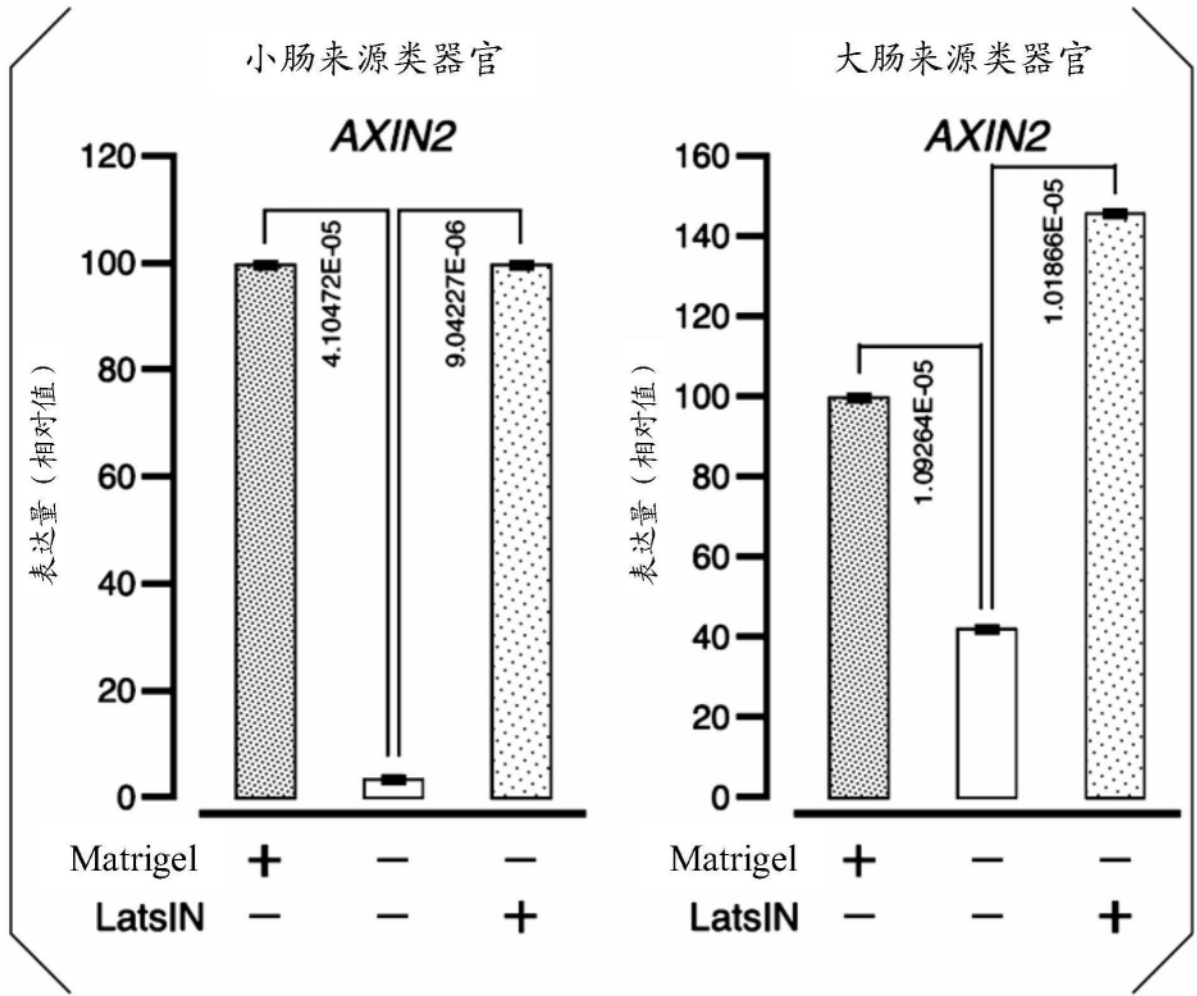


图16

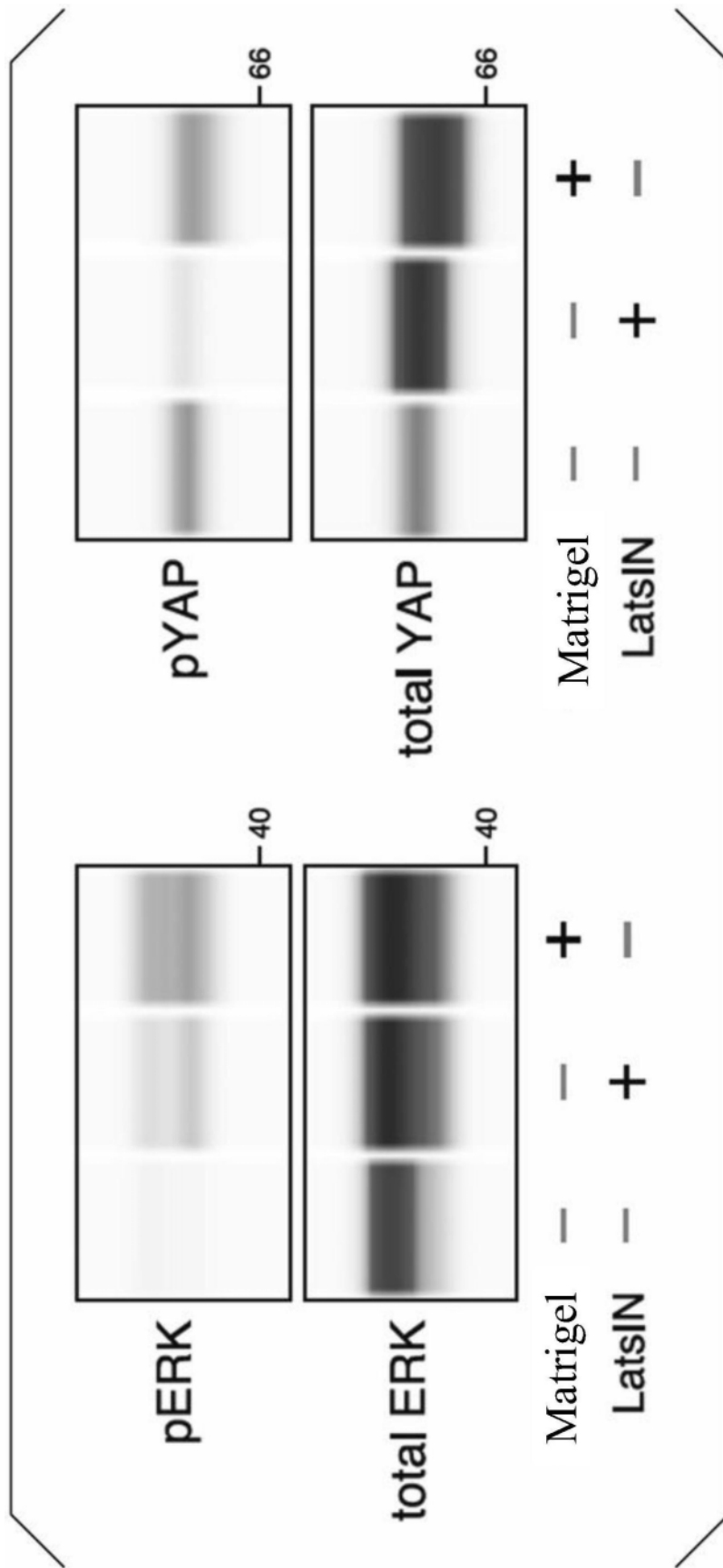


图17

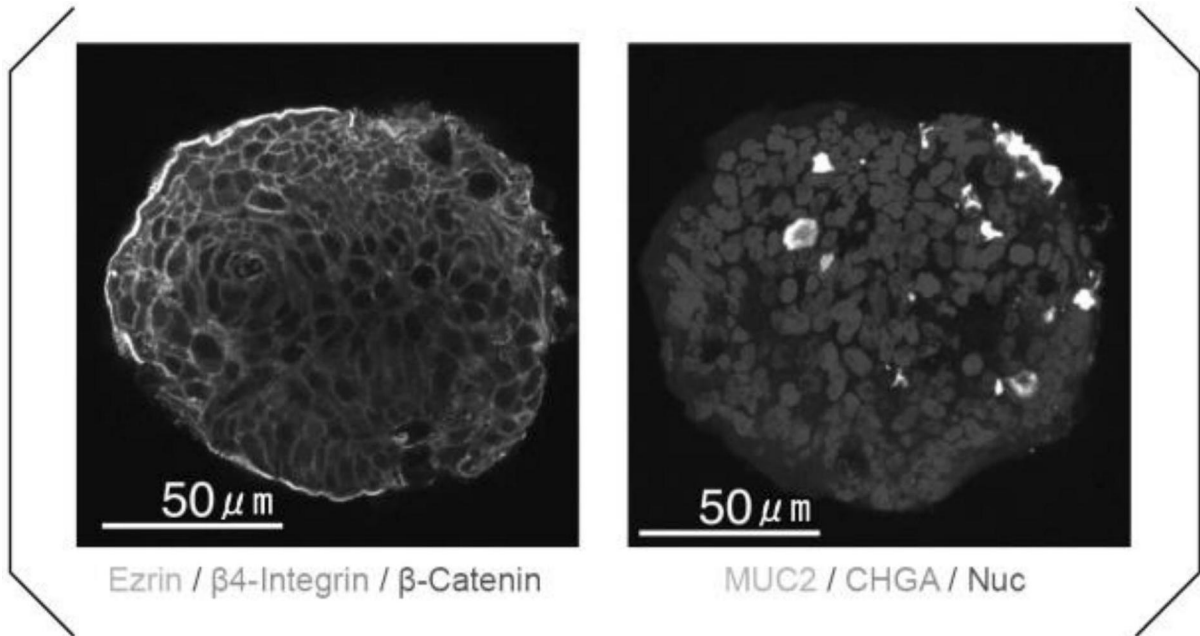


图18

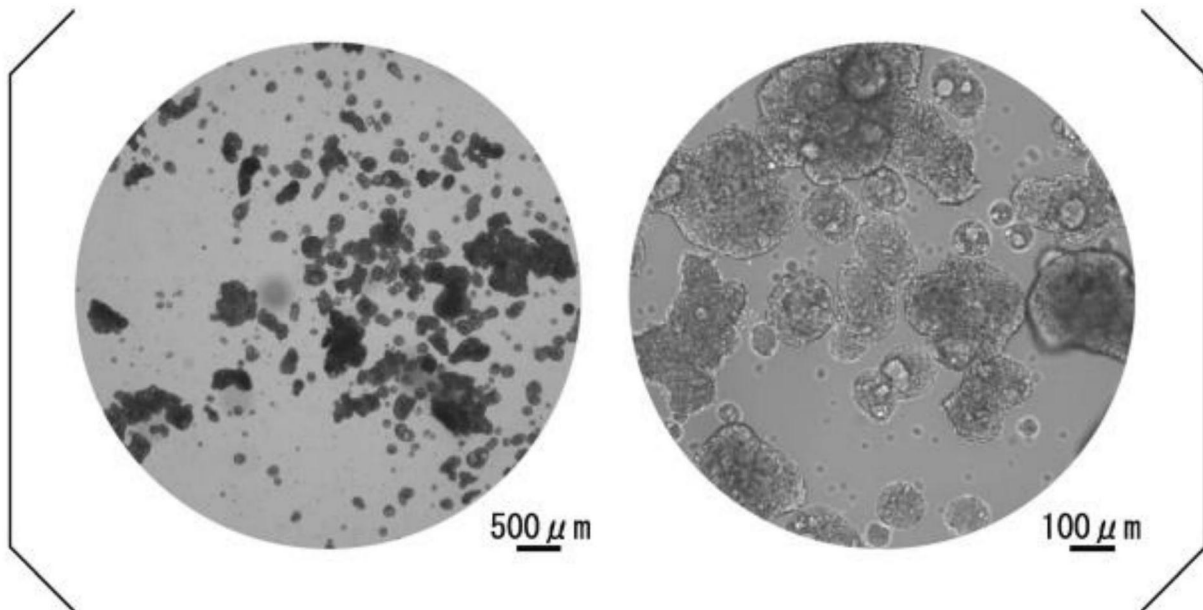


图19

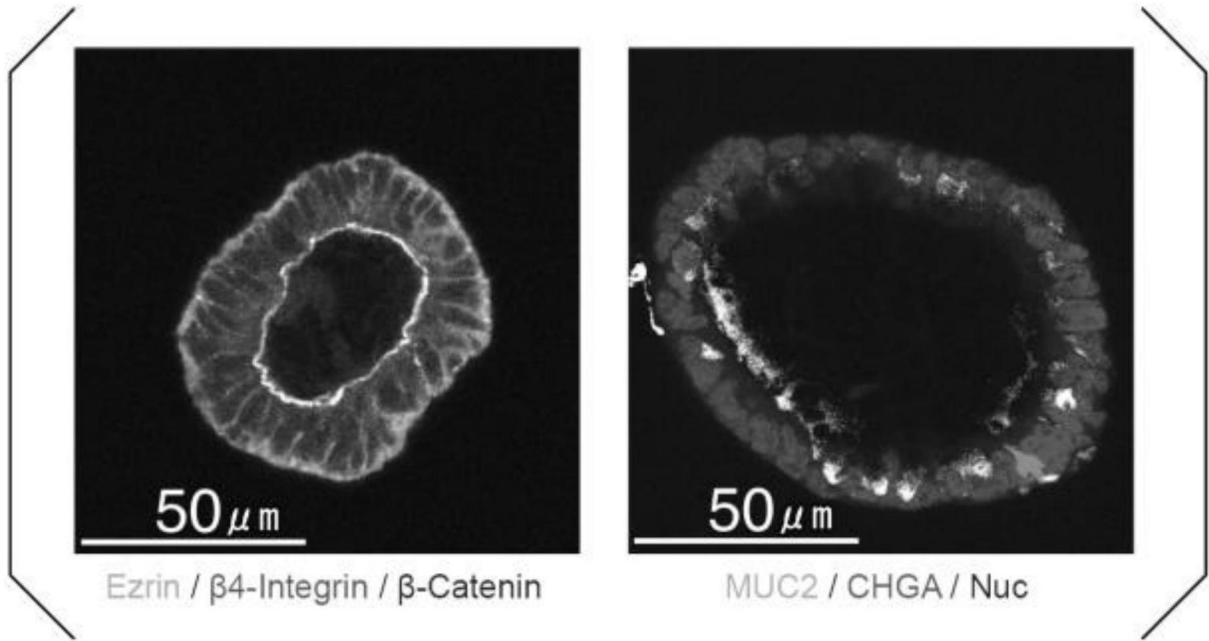


图20

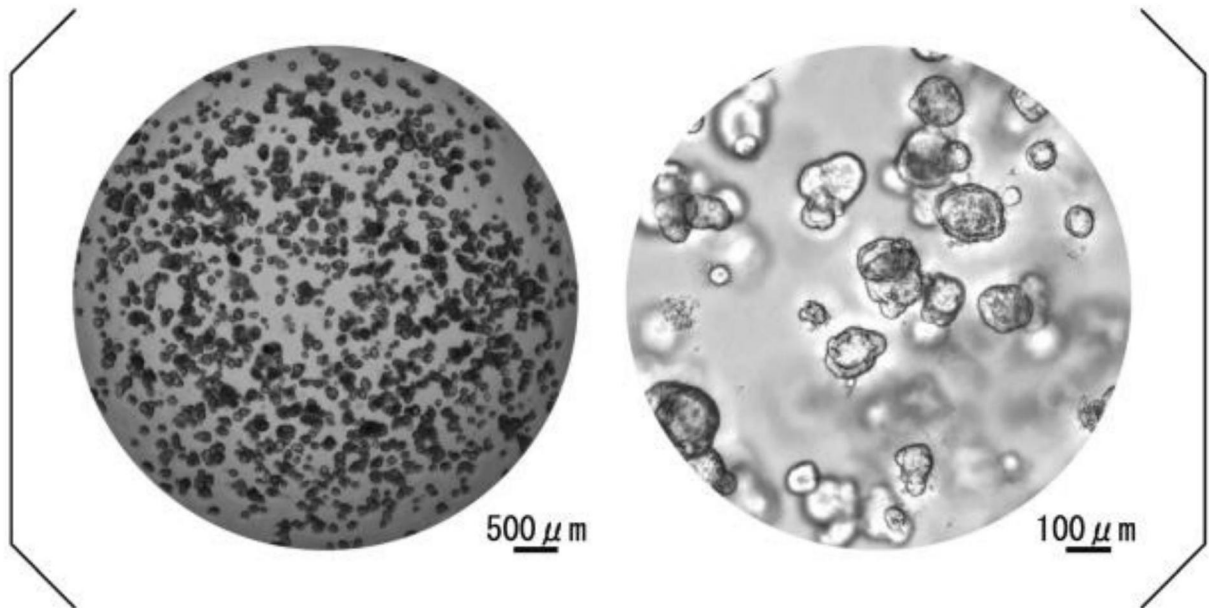


图21

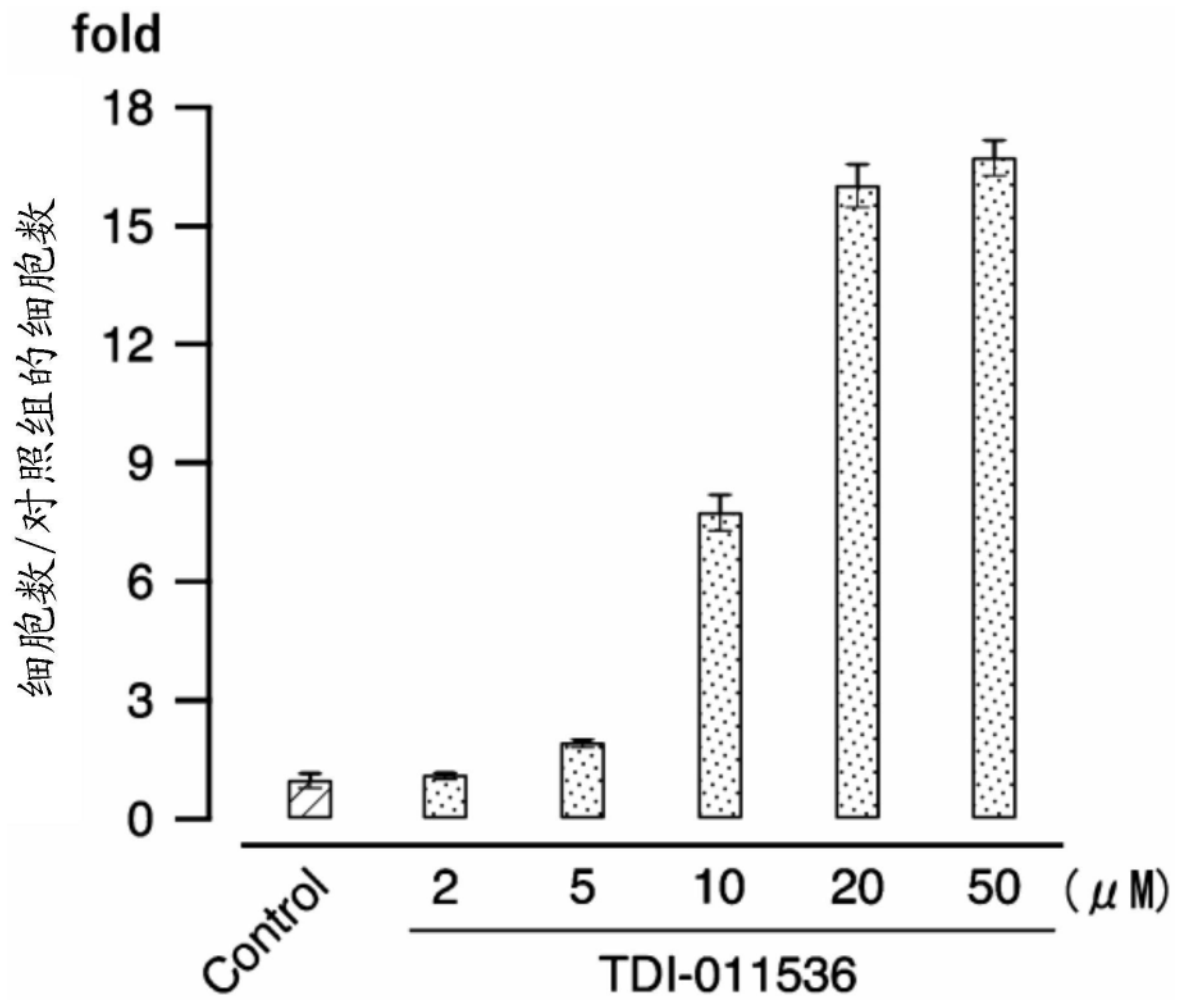


图22

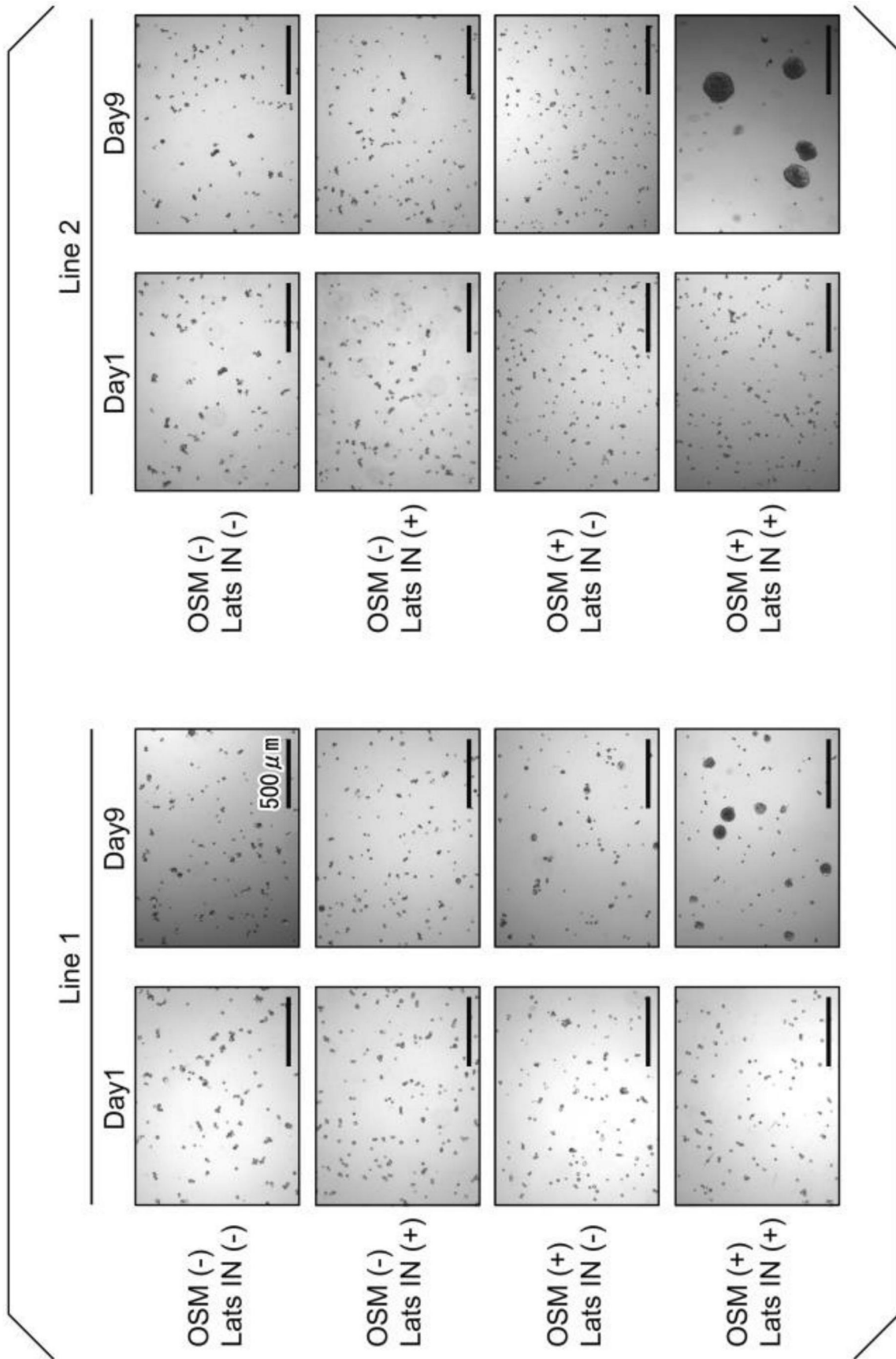


图23

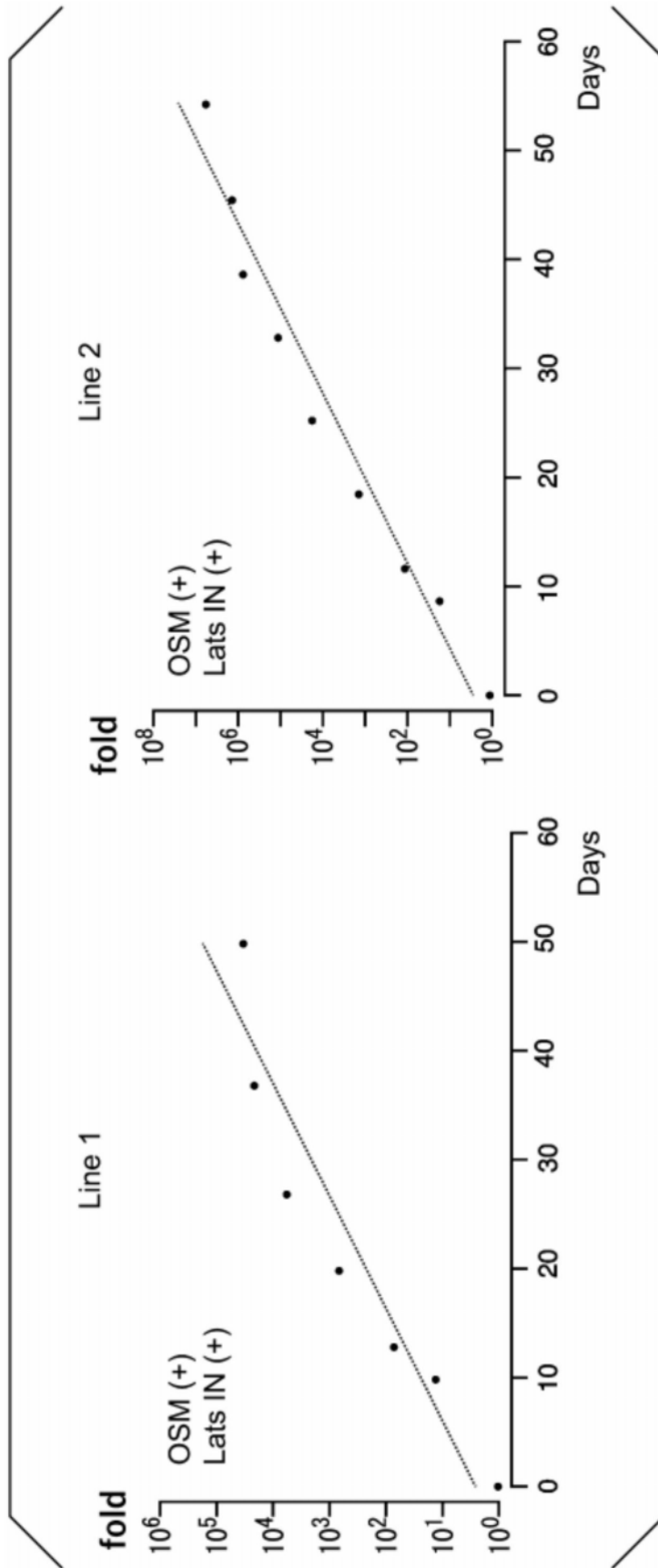


图24

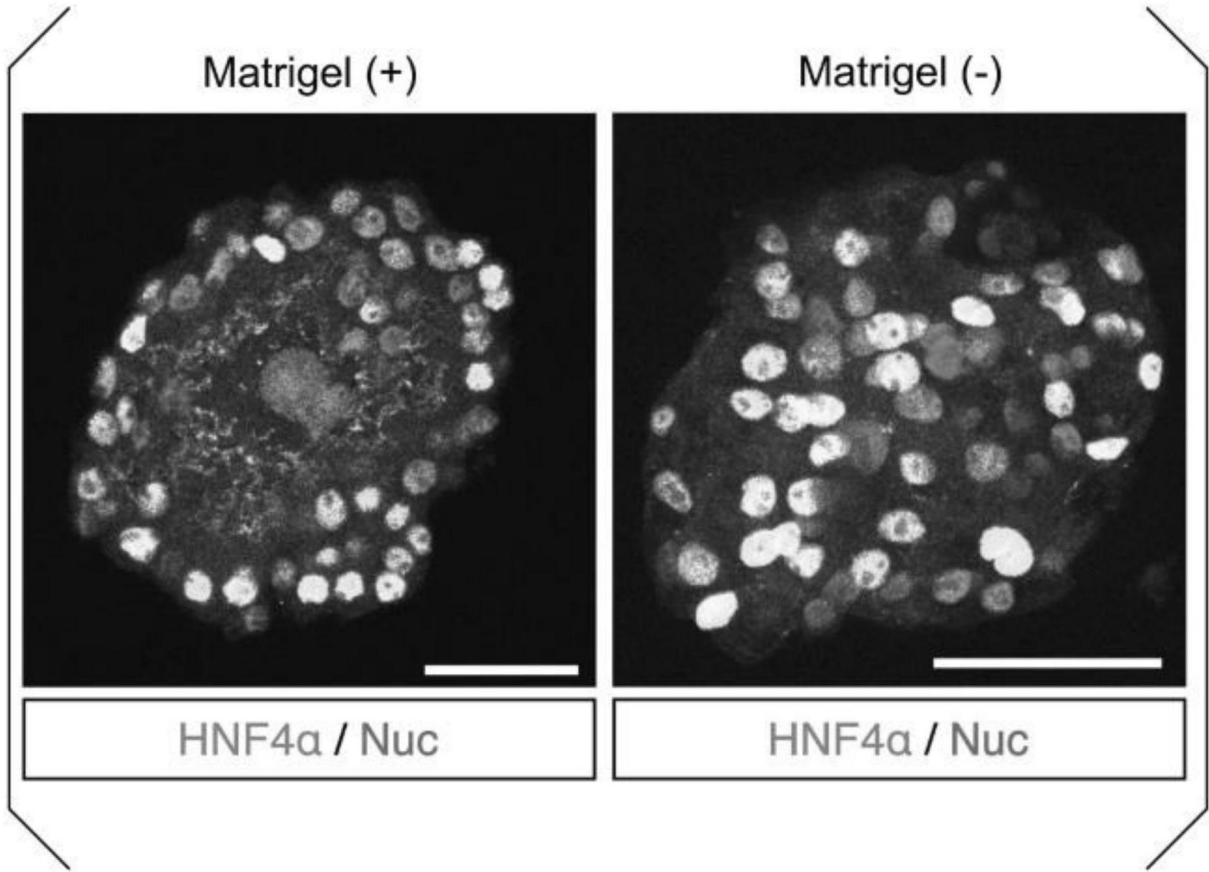


图25

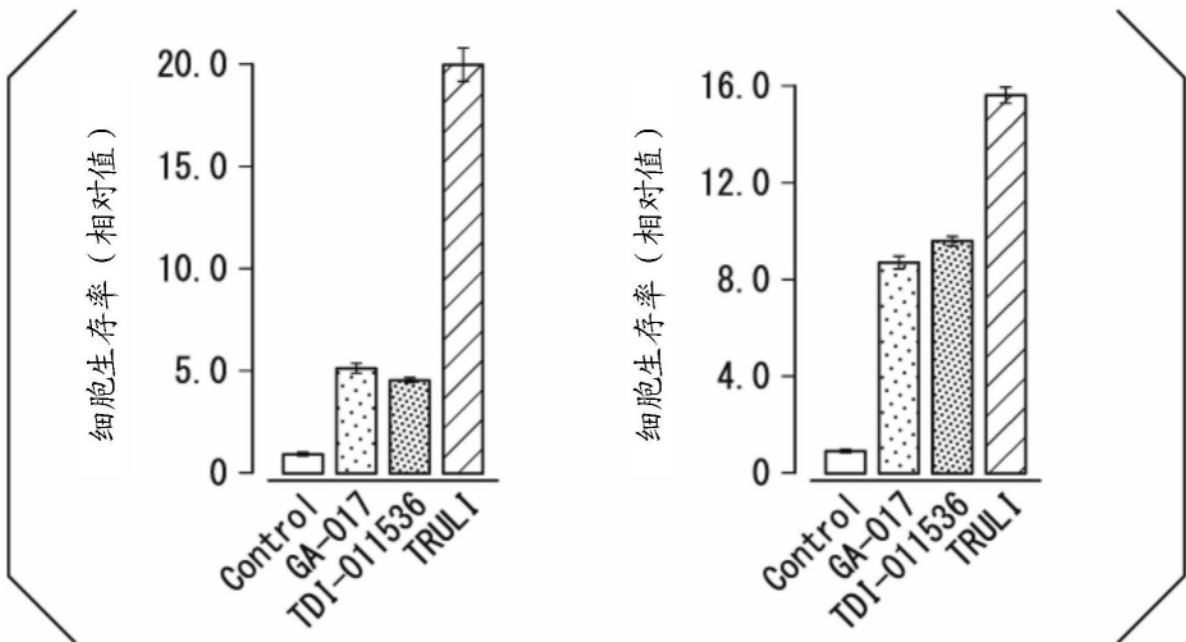


图26

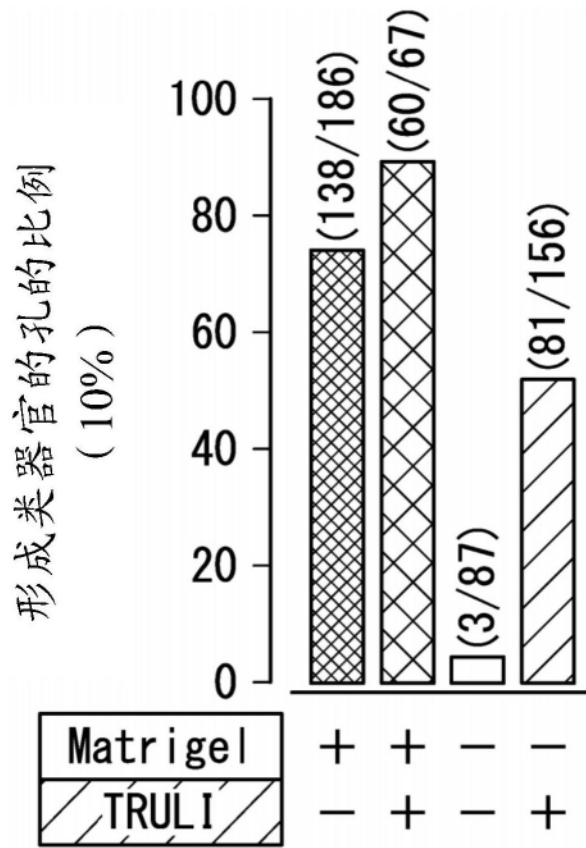


图27

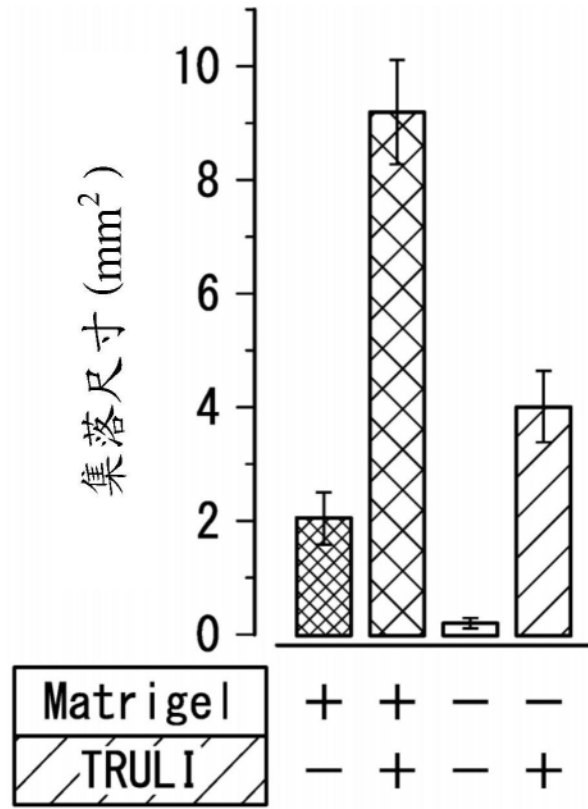


图28

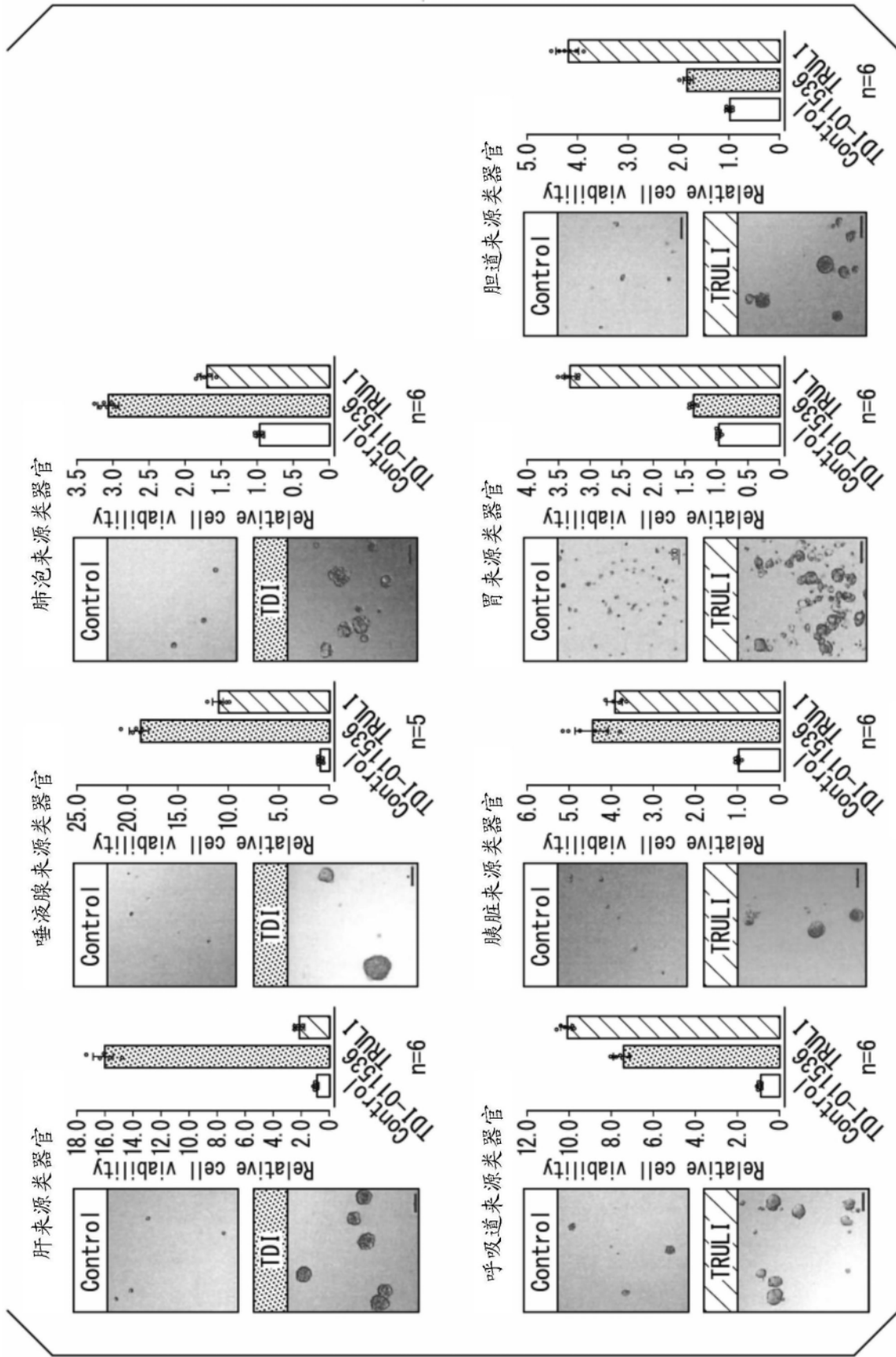


图29

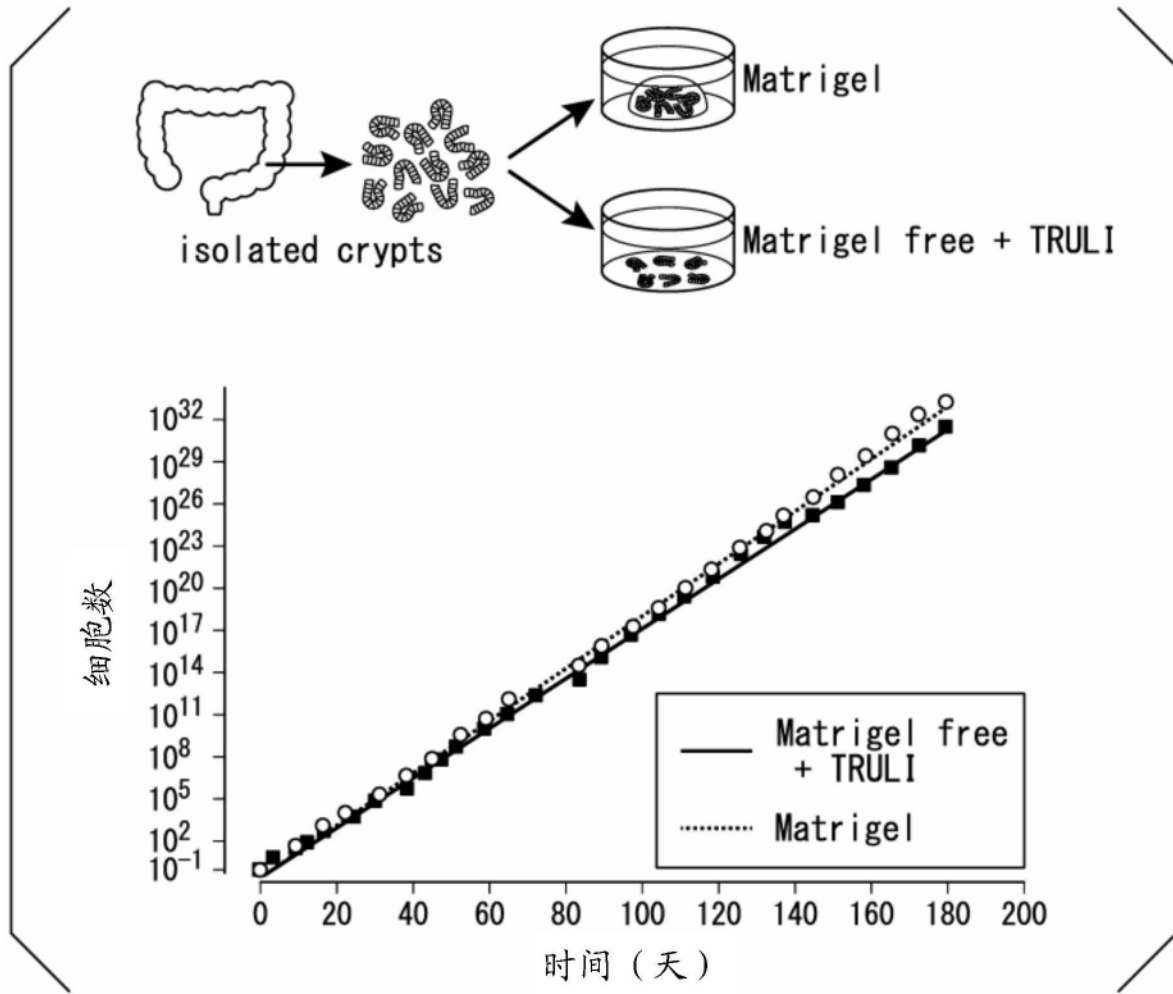


图30

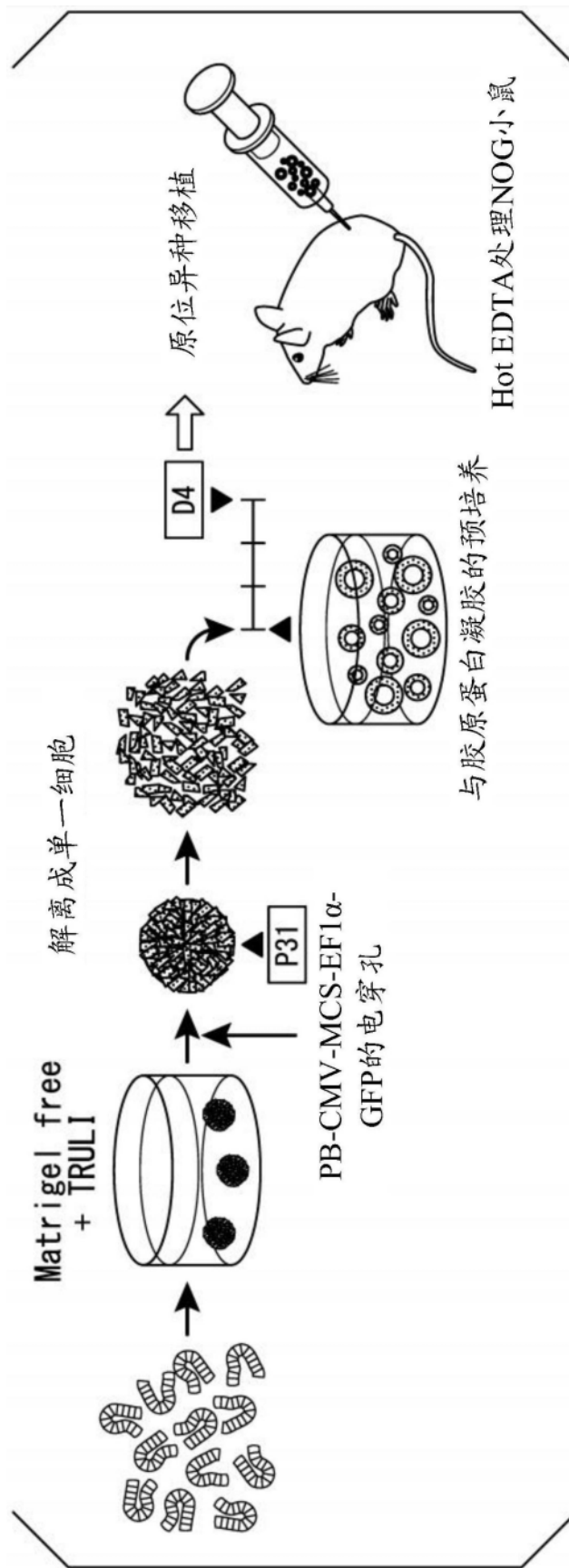


图31

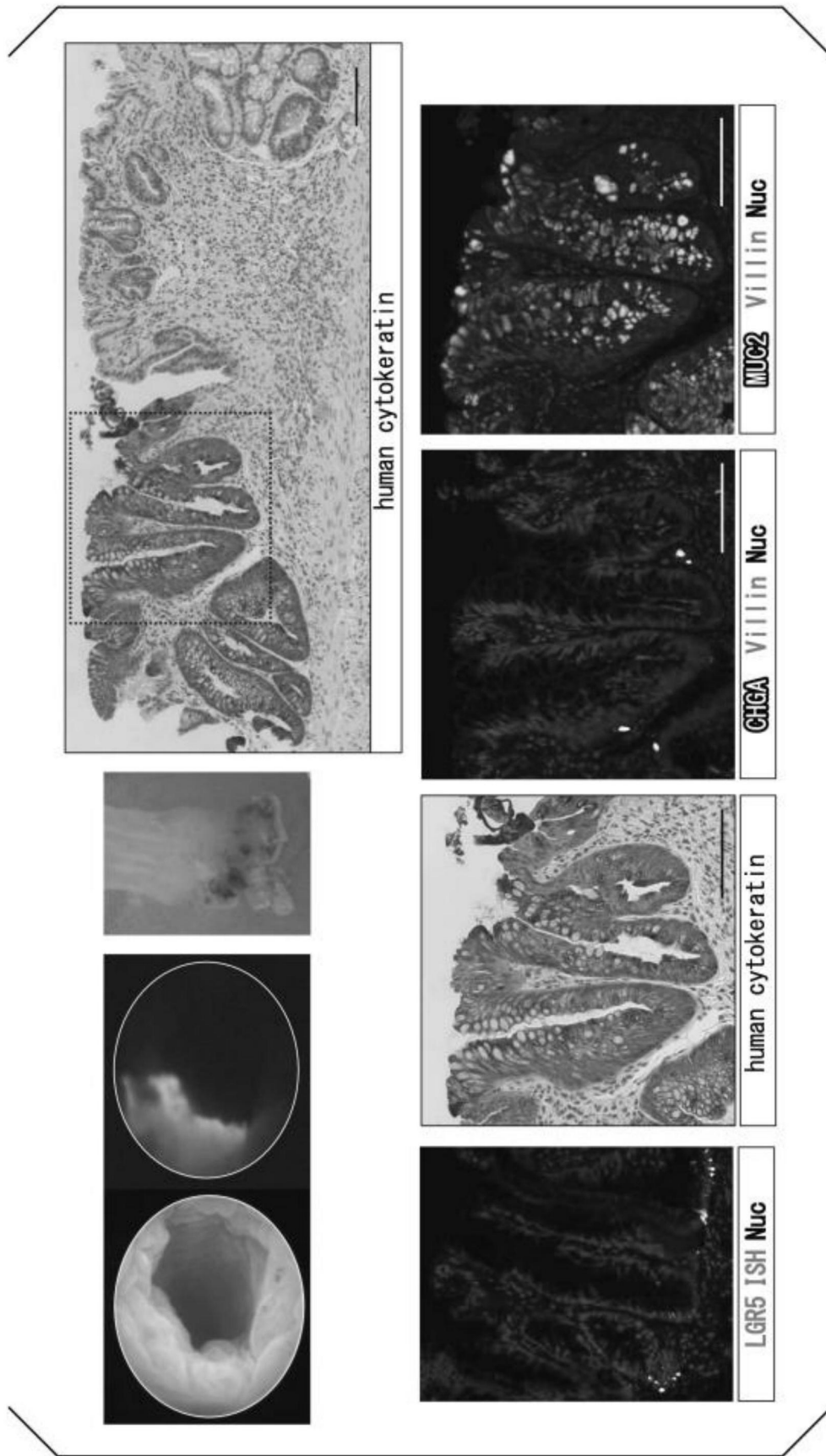


图32